

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : Biologie et Santé*  
**École Doctorale SICMA**

présentée par

**Alexandre Nouël**

Préparée au Laboratoire d'Immunologie,  
Pathologie et Immunothérapie EA2216

# Etude du lymphocyte B au cours du rejet d'allogreffe rénale

**Thèse soutenue le 15 octobre 2013**

devant le jury composé de :

**Sophie BROUARD**

DR2, Université de Nantes / Rapporteur

**Olivier THAUNAT**

PHU, Université de Lyon / Rapporteur

**Yannick LE MEUR**

PU-PH, Université de Bretagne Occidentale / Examineur

**Sophie HILLION**

MCU-PH, Université de Bretagne Occidentale / Directrice de thèse

*Une condition essentielle de l'hypothèse (scientifique),*

*c'est qu'elle soit aussi probable que possible.*

**Claude BERNARD**

# REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord un grand merci à **Sophie Hillion** sans qui je n'aurai jamais pu faire cette thèse. Je suis arrivé sur Brest parce qu'elle a cru en moi et je lui en suis éternellement reconnaissant. Ses conseils, sa patience et son côté très pédagogue m'ont permis de progresser tout au long de ces trois années. Toujours le mot juste, elle m'a aidé à faire face à toutes les situations même quand cela n'a pas été facile. Un grand MERCI !

Merci ensuite au Professeur **Jacques-Olivier PERS** pour m'avoir guidé au cours de cette thèse et pour son implication dans la réussite de mon travail. Je suis ravi d'avoir effectué mon premier vol à ses côtés et je n'oublierai pas cette semaine Grecque extraordinaire.

Je remercie également **Christophe Jamin**, que j'ai notamment appris à découvrir lors des longs conseils scientifiques de l'Université. Les dépenses associées à mon travail se sont toujours faites dans la bonne humeur avec lui, même si j'étais parfois trop souvent dans son bureau.

Je remercie particulièrement Tinhinane, alias **Tina**, sans qui ma thèse n'aurait pas été la même. Plus qu'une collègue de travail, c'est une amie très chère qui a toujours été là pour moi. Je lui souhaite tout le bonheur qu'elle mérite pour la suite et surtout j'espère ne pas la perdre de vue.

Je n'oublie pas **Pierre**, qui a contribué à la bonne humeur du laboratoire ;) Petit clin d'œil à l'humour noir que nous avons partagé ! Merci pour son aide en anglais quand j'en ai eu besoin, Google Translate et Reverso n'ont qu'à bien se tenir.

De grands remerciements à **Ahsen** pour m'avoir permis de donner ma première conférence internationale. Merci pour son accueil lors de cette semaine fabuleuse à Athènes. Une amie sincère que j'espère pouvoir revoir le plus souvent possible.

Merci aussi à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer durant ce doctorat : Sébastien, Thomas, Mariam, Marie-Michèle, Juliette, Carole, Quentin, Ayan, Yosra, Achouak, Kahina, Jean-François, Christelle, Laëtitia, Yves, et Ben. Elles ont toutes contribué à la bonne ambiance du laboratoire.

Je tiens à remercier les étudiants que j'ai encadré et qui ont participé à mon projet : Noëllie, Erwan, Xavier, Jason et Mélanie.

J'adresse également un grand merci au service de Néphrologie de la Cavale Blanche, en particulier aux infirmières de l'hôpital de jour qui ont toujours été très agréables et serviables avec moi. Merci aussi au Professeur **Yannick Le Meur** pour son investissement dans ce travail et les informations cliniques apportées.

Un grand merci à **Isabelle** qui m'a appris les bases pour bien débiter ma thèse au laboratoire. Elle a toujours été présente pour le côté clinique de mon projet et m'a permis d'en connaître beaucoup plus sur le rein. Elle a également été mon cobaye pour tester mes blagues à mon arrivée sur Brest et j'imagine que cela devait parfois être éprouvant ;)

Je remercie le personnel du laboratoire d'anatomopathologie pour la préparation des lames de biopsies de patients, ce qui m'a permis de gagner énormément de temps au cours de ma thèse en assurant notamment un travail de qualité. Je remercie particulièrement le docteur **Laurent Doucet**, pour sa gentillesse, son écoute et sa patience, ainsi que le temps qu'il m'a consacré à l'étude des biopsies.

Je n'oublie pas de remercier les techniciennes et les secrétaires du laboratoire pour leur contribution à l'ambiance du labo : Annie, Christine LF, Christine C, Nelly, Sylvie, Simone et Geneviève. Ça n'a pas toujours été facile de me supporter avec mes petites blagues incessantes mais je suis sûr que ça va vous manquer ;)

J'adresse également mes remerciements à **Sophie Brouard** et **Olivier Thaumat** qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse et pour le temps qu'ils m'ont accordé.

Je tiens à remercier aussi le Professeur **Pierre Youinou** de m'avoir accueilli au sein du laboratoire au départ du projet, de m'avoir fait confiance et soutenu.

Enfin, je remercie **Jennifer** avec qui j'ai eu une adorable petite fille, **Lyah**, au cours de cette thèse. Ce bonheur a contribué à la réussite de ce projet et je les remercie toutes les deux pour leur soutien mais également pour avoir supporté que j'emmène du travail à la maison. Je n'oublie pas **Fidji** qui a toujours été de très bonne compagnie, en particulier lors des repas.

Je terminerai en remerciant également toute ma famille. En particulier à Yannick, Sandrine, Matthieu et ma sœur Justine pour leur contribution intellectuelle lors de la relecture de ma thèse. Pour terminer, un grand merci à mes parents qui m'ont donné la chance de pouvoir faire des études, qui m'ont toujours soutenu et m'ont fait confiance. J'espère les rendre fier de ce que je suis devenu.



# **TABLE DES MATIERES**

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>15</b>
I. LE LYMPHOCYTE B .....	16
1. <i>Origine et développement des lymphocytes B</i> .....	16
1.1. Les lymphocytes B transitionnels.....	17
1.2. Les lymphocytes B des organes lymphoïdes secondaires .....	18
1.2.1. Les lymphocytes B folliculaires .....	18
1.2.2. Les lymphocytes B de la zone marginale .....	20
1.3. Les lymphocytes B circulants .....	20
2. <i>Les nombreux rôles du lymphocyte B</i> .....	21
2.1. Une cellule productrice d'anticorps .....	21
2.2. Une cellule présentatrice d'antigènes.....	21
2.3. Sécrétion de cytokines et polarisation de la réponse immune .....	22
II. L'ÉMERGENCE DU LYMPHOCYTE B RÉGULATEUR .....	22
1. <i>La découverte des lymphocytes B régulateurs</i> .....	22
1.1. Dans les modèles animaux .....	22
1.2. Chez l'Homme.....	23
2. <i>Phénotype des lymphocytes B régulateurs</i> .....	25
2.1. Phénotype des lymphocytes B régulateurs murins.....	26
2.2. Phénotype des lymphocytes B régulateurs humains .....	27
3. <i>Induction des lymphocytes B régulateurs</i> .....	28
3.1. L'interaction CD40/CD40L .....	29
3.2. L'engagement du BCR.....	29
3.3. La voie des TLRs .....	30
3.4. L'IL21.....	31
4. <i>Mécanismes d'action des lymphocytes B régulateurs</i> .....	31
4.1. Régulation par sécrétion de facteurs solubles .....	32
4.1.1. L'IL-10 .....	32
4.1.2. Le TGFβ .....	34
4.2. Régulation par l'enzyme IDO.....	34
4.3. Régulation par contact cellulaire .....	35
4.3.1. La molécule CD40 .....	35
4.3.2. Les molécules CD80 et le CD86.....	35
4.3.3. Les autres molécules .....	36
4.4. Régulation par induction de lymphocytes T régulateurs .....	36
III. LA TRANSPLANTATION RENALE .....	37
1. <i>Mécanismes immunologiques du rejet</i> .....	37
1.1. La reconnaissance allogénique .....	38
1.2. Activation des lymphocytes T .....	39
1.2.1. Activation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	39
1.2.2. Activation des lymphocytes Th17 .....	39
1.2.3. Mécanismes de destruction tissulaire via les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	40
2. <i>Les différents types de rejet</i> .....	40
2.1. Le rejet cellulaire aigu.....	41
2.2. Le rejet humoral chronique .....	42
3. <i>Le lymphocyte B en transplantation</i> .....	42
3.1. Lymphocyte B et rejet.....	43
3.1.1. Anticorps anti-HLA.....	43
3.1.2. Les centres germinatifs ectopiques .....	43
3.2. Lymphocyte B et tolérance .....	44
3.2.1. Le lymphocyte B dans les modèles animaux de tolérance .....	44
3.2.2. Le lymphocyte B et la tolérance chez l'Homme.....	45
IV. PROBLÉMATIQUE .....	46
<b>RESULTATS .....</b>	<b>48</b>
<b>LE LYMPHOCYTE B DANS LE REJET HUMORAL CHRONIQUE PRESENTE UNE DISTRIBUTION ANORMALE ET UNE ALTERATION DE SES FONCTIONS SUPPRESSIVES .....</b>	<b>49</b>
I. INTRODUCTION.....	50

II.	MATERIEL ET METHODES .....	50
1.	Groupe d'étude.....	50
2.	Culture cellulaire .....	52
2.1.	Isolation des cellules à partir du sang périphérique .....	52
2.2.	Conditions de culture cellulaire .....	52
3.	Etude de la prolifération.....	53
4.	Dosage des cytokines.....	54
5.	Cytométrie en flux et tri .....	54
5.1.	Phénotypage des cellules .....	54
5.2.	Tri cellulaire.....	54
6.	Analyses statistiques .....	55
III.	RESULTATS .....	59
1.	Le déséquilibre de distribution des sous-populations de LB et de LT des patients cABMR.....	59
1.1.	Les lymphocytes B .....	59
1.2.	Les lymphocytes T.....	64
2.	Le défaut de régulation des LB des patients cABMR.....	66
IV.	CONCLUSION.....	72
<b>IMPLICATION DE LA VOIE TGFB/IDO DANS LES MECANISMES DE REGULATION DU LYMPHOCYTE B.....</b>		<b>73</b>
I.	INTRODUCTION.....	74
II.	MATERIEL ET METHODES .....	74
1.	Groupe d'étude.....	74
2.	Culture cellulaire .....	74
3.	Dosage des cytokines.....	75
4.	Cytométrie en flux.....	75
5.	Analyses statistiques .....	75
III.	RESULTATS .....	76
1.	Le rôle de l'IL-10 et du TGFβ en coculture .....	76
2.	Les fonctions régulatrices du LB font intervenir un axe régulateur TGFβ/IDO .....	77
3.	Les LB des patients cABMR sont déficients dans la sécrétion en IDO.....	80
4.	Les LB des patients cABMR n'induisent pas de Tregs .....	81
5.	Les LB de patients cABMR sont déficients dans leur sécrétion en IL-10 et en TGFβ .....	82
IV.	CONCLUSION .....	82
<b>CARACTERISATION DES POPULATIONS DE LB DANS LE REJET CELLULAIRE AIGU.....</b>		<b>84</b>
I.	INTRODUCTION.....	85
II.	MATERIEL ET METHODES .....	85
1.	Groupes d'étude .....	85
2.	Culture cellulaire .....	86
3.	Cytométrie.....	86
4.	Microscopie .....	87
4.1.	Immunofluorescence et microscopie confocale .....	87
4.2.	Immunohistochimie <i>in situ</i> .....	87
5.	Analyses statistiques .....	88
III.	RESULTATS .....	90
1.	Les sous-populations de LB des patients ACR ne présentent pas de défaut de distribution.....	90
1.1.	Les lymphocytes B .....	90
1.2.	Les lymphocytes T.....	93
2.	Les LB de patients ACR sont régulateurs .....	94
3.	Caractérisation des LB de patients ACR sur coupes de biopsie.....	95
IV.	CONCLUSION .....	100
<b>ETUDE DE L'INFLUENCE DU LYMPHOCYTE B SUR LE TH17 .....</b>		<b>102</b>
I.	INTRODUCTION.....	103
II.	MATERIEL ET METHODES .....	103
1.	Groupe d'étude.....	103
2.	Culture cellulaire .....	103
2.1.	Isolation des cellules à partir du sang périphérique .....	103

2.2.	Conditions de culture.....	104
3.	<i>Analyse de l'expression des messagers</i> .....	104
3.1.	Extraction des acides ribonucléiques (ARN) .....	104
3.2.	Rétrotranscription (RT) de l'ARN .....	104
3.3.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	105
3.3.1.	PCR .....	105
3.3.2.	PCR quantitative (PCRq) .....	105
4.	<i>Dosage des cytokines</i> .....	106
5.	<i>Cytométrie en flux</i> .....	106
6.	<i>Analyse statistiques</i> .....	106
III.	RESULTATS .....	107
1.	<i>Mise en place d'un modèle in vitro de différenciation en Th17</i> .....	107
2.	<i>Influence du LB sur la différenciation en Th17</i> .....	110
IV.	CONCLUSION .....	111
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>112</b>
I.	LE PHENOTYPE DES LB DANS LE REJET .....	113
1.	<i>Le rejet humoral chronique</i> .....	113
1.1.	La composition du groupe cABMR.....	113
1.2.	Les lymphocytes B du sang périphérique dans le cABMR.....	114
1.3.	Le ratio Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5 .....	116
1.4.	Les LT.....	116
2.	<i>Les données cliniques</i> .....	117
2.1.	La composition du groupe stable .....	117
2.2.	La fonction rénale n'a pas d'impact sur la distribution des LB .....	117
2.3.	Les traitements immunosuppresseurs n'influencent pas la distribution des LB .....	118
3.	<i>Le rejet cellulaire aigu</i> .....	119
3.1.	Le phénotype des lymphocytes dans le sang périphérique .....	119
3.2.	Le phénotype des lymphocytes dans le greffon.....	120
3.2.1.	L'infiltrat leucocytaire .....	120
3.2.2.	Les LB infiltrés.....	121
—	Les LB mémoires.....	121
—	Les LB activés.....	122
3.2.3.	La relation LT/LB .....	123
3.2.4.	Perspectives.....	124
II.	LA REGULATION B DANS LE REJET.....	125
1.	<i>Dans le rejet humoral chronique</i> .....	125
1.1.	Le modèle de coculture LT/LB .....	125
1.2.	Le potentiel régulateur des sous-populations de LB .....	127
1.3.	Le défaut intrinsèque des LB.....	130
1.3.1.	L'IL-10 et le TGFβ .....	130
1.3.2.	L'indoleamine 2,3-dioxygénase .....	131
2.	<i>Dans le rejet cellulaire aigu</i> .....	136
2.1.	Le modèle de différenciation Th17 .....	137
2.2.	La relation LB/Th17 .....	138
III.	LES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES DANS LE REJET.....	140
1.	<i>Les projets du laboratoire</i> .....	140
2.	<i>Les thérapies anti-LB</i> .....	140
3.	<i>Les thérapies pro-Bregs</i> .....	142
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>145</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>156</b>
	<b>ARTICLE N°1: REGULATORY B CELLS: AN EXCITING TARGET FOR FUTURE THERAPEUTICS IN TRANSPLANTATION.</b> .....	<b>157</b>
	<b>ARTICLE N°2: B-CELLS DISPLAY AN ABNORMAL DISTRIBUTION AND AN IMPAIRED SUPPRESSIVE FUNCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC ANTIBODY MEDIATED REJECTION. ....</b>	<b>182</b>

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

# FIGURES

Figure 1.	Représentation de l'ontogenèse des lymphocytes B.	16
Figure 2.	Schéma d'un follicule lymphoïde.	19
Figure 3.	Les trois grandes voies impliquées dans la génération des Bregs.	29
Figure 4.	Les mécanismes d'action des Bregs.	32
Figure 5.	Représentation simplifiée des mécanismes immunologiques du rejet de greffe.	38
Figure 6.	Représentation schématique du modèle de coculture.	53
Figure 7.	Analyse de la population de LB CD19 <sup>+</sup> du sang périphérique.	59
Figure 8.	Analyse des différentes sous-populations de LB matures du sang périphérique.	60
Figure 9.	Analyse de la distribution des sous-populations de LB transitionnels dans le sang périphérique.	61
Figure 10.	Analyse de la distribution des sous-populations de LB mémoires dans le sang périphérique.	63
Figure 11.	Analyse de la distribution des LT dans le sang périphérique.	65
Figure 12.	Le LB dans le rejet humoral chronique n'a pas de propriétés régulatrices.	67
Figure 13.	Analyse de la sécrétion d'IFN $\gamma$ et de TNF $\alpha$ en coculture.	67
Figure 14.	Analyse du phénotype des LB transitionnels en coculture.	69
Figure 15.	Analyse du phénotype des populations de LB IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>+/fort</sup> , IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>faible</sup> , IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> et IgD <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> en coculture.	70
Figure 16.	Les sous-populations de LB purifiées présentent des capacités suppressives différentes.	71
Figure 17.	L'IL10 et le TGF $\beta$ jouent deux rôles distincts en coculture.	77
Figure 18.	La régulation B passe par un axe TGF/IDO en coculture.	79
Figure 19.	Les LB de patients cABMR expriment faiblement IDO en coculture.	80
Figure 20.	Les LB des patients cABMR sont incapables de générer des Tregs.	81
Figure 21.	Les LB des patients cABMR expriment faiblement l'IL-10 et le TGF $\beta$ en coculture.	82
Figure 22.	Analyse de la population de LB CD19 <sup>+</sup> dans le sang périphérique.	90
Figure 23.	Analyse des différentes sous-populations de LB matures dans le sang périphérique.	91
Figure 24.	Analyse de la distribution des sous-populations de LB transitionnels dans le sang périphérique.	91
Figure 25.	La distribution des sous-populations de LB mémoires dans le sang périphérique.	92
Figure 26.	La distribution des LT dans le sang périphérique.	94
Figure 27.	Le LB dans le rejet cellulaire aigu inhibe la prolifération des LT.	95
Figure 28.	Images représentatives de l'infiltrat cellulaire par immunohistochimie sur des coupes de biopsies de patients ACR.	96
Figure 29.	Images représentatives de l'infiltrat de LT et de LB par immunofluorescence sur des coupes de biopsies de patients ACR et ST.	97
Figure 30.	Images représentatives du marquage CD20/CD27 par immunofluorescence sur des coupes de biopsies de patients ACR.	98
Figure 31.	Image représentative du marquage CD20/CD38 par immunofluorescence sur des coupes de biopsies de patients ACR.	98
Figure 32.	Image représentative du marquage IgD/CD38 par immunofluorescence sur des coupes de biopsies de patients ACR.	99
Figure 33.	Analyse de l'expression de RORc dans les TH17.	107
Figure 34.	Analyse de l'expression de l'IL-17 dans les TH17.	108

Figure 35.	Analyse de l'expression de CCR6 dans les Th17.....	109
Figure 36.	Analyse de l'expression de l'IL-17 dans les Th17 en coculture. ....	110
Figure 37.	Analyse de l'expression de CCR6 dans les Th17 en coculture. ....	111
Figure 38.	Comparaison des ratios Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5 de patients ST à court et long terme. ....	117
Figure 39.	Analyse du ratio Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5 de patients cABMR, de ST, de CD et de volontaires sains (Témoin). ....	118
Figure 40.	Représentation hypothétique de l'évolution de l'infiltrat cellulaire dans le greffon au cours du rejet cellulaire aigu. ....	125
Figure 41.	Les LB de patients CD inhibent la prolifération des LT en coculture autologue. ....	127
Figure 42.	Le déséquilibre de distribution des lymphocytes B dans le cABMR.....	129
Figure 43.	Le rôle d'IDO dans l'inhibition de la prolifération des LT. ....	134
Figure 44.	L'apparition des cellules régulatrices en coculture. ....	136

## TABLEAUX

Tableau 1.	Phénotype des LB immatures, transitionnels, des LB de la zone marginale et des LB matures chez l'Homme. ....	21
Tableau 2.	La naissance des Bregs chez l'Homme et la souris.....	25
Tableau 3.	Anticorps utilisés en cytométrie. ....	54
Tableau 4.	Caractéristiques immunologiques des patients stables (ST) .....	56
Tableau 5.	Caractéristiques immunologiques des patients ayant développé un rejet humoral chronique (cABMR) .....	57
Tableau 6.	Caractéristiques cliniques des patients ST et cABMR.....	58
Tableau 7.	Anticorps utilisés en cytométrie. ....	86
Tableau 8.	Anticorps utilisés en microscopie confocale. ....	87
Tableau 9.	Caractéristiques immunologiques des patients ayant développé un rejet cellulaire aigu (ACR) .....	89
Tableau 10.	Tableau récapitulatif du phénotype des LB chez les patients ACR.....	100
Tableau 11.	Amorces utilisées en PCR .....	105
Tableau 12.	Sondes utilisées en PCRq.....	106



## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**1-MT** : 1-Méthyl-DL-Tryptophan  
**Ac** : Anticorps  
**ACR** : Acute cellular rejection (= rejet cellulaire aigu)  
**ADNc** : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire  
**Ag** : Antigène  
**AID** : Activation-Induced (cytidine) Deaminase  
**ALC** : Antigène Leucocytaire Commun  
**ARN** : Acide RiboNucléique  
**B10** : Lymphocyte B sécréteur d'IL-10  
**BAFF** : B-cell Activating Factor belong to TNF Family  
**BCR** : B-Cell Receptor  
**Be1 et 2** : Lymphocyte B effecteur de type 1 et 2  
**Bm** : Lymphocyte B mature  
**Br3** : BAFF receptor 3  
**Breg** : Lymphocyte B régulateur  
**BSA** : Bovine Serum Albumin  
**cABMR** : chronic AntiBody Mediated Rejection (= rejet humoral chronique)  
**c-Cbl** : c-Casitas B-lineage Lymphoma  
**CCR** : Chemokine (C-C motif) Receptor  
**CD** : Dysfonction Chronique  
**CD40L** : CD40 Ligand  
**CFSE** : CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester  
**CG** : Centre Germinatif  
**CK2** : Caséine Kinase 2  
**CMH I et II** : Complexe Majeure d'Histocompatibilité de type I et II  
**CPA** : Cellule Présentatrice d'Antigènes  
**CpG** : Cytidine phosphate Guanosine  
**CR** : Rejet Chronique  
**CTL** : Lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxique  
**CTLA-4** : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4  
**CXCL** : Chémokine (C-X-C motif) ligand 1  
**DAB** : DiAminoBenzidine  
**DC** : Cellule Dendritique  
**DEPC** : Di-Ethyl Pyro-Carbonate  
**dNTPs** : Déoxynucléotides triphosphates  
**DSA** : Donor Specific Antibody  
**DTT** : Dithiothréitol  
**EAE** : Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale  
**FasL** : Fas Ligand  
**FDC** : Cellule Dendritique Folliculaire  
**FIAT** : Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire  
**FITC** : IsoThioCyanate de Fluorescéine  
**Foxp3** : Forkhead box p3  
**GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**GITR(L)** : Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor (Ligand)  
**HLA** : Human Leucocyte Antigen  
**IDO** : Indoleamine 2,3-dioxygénase  
**IFN $\gamma$**  : Interféron  $\gamma$   
**Ig** : Immunoglobuline

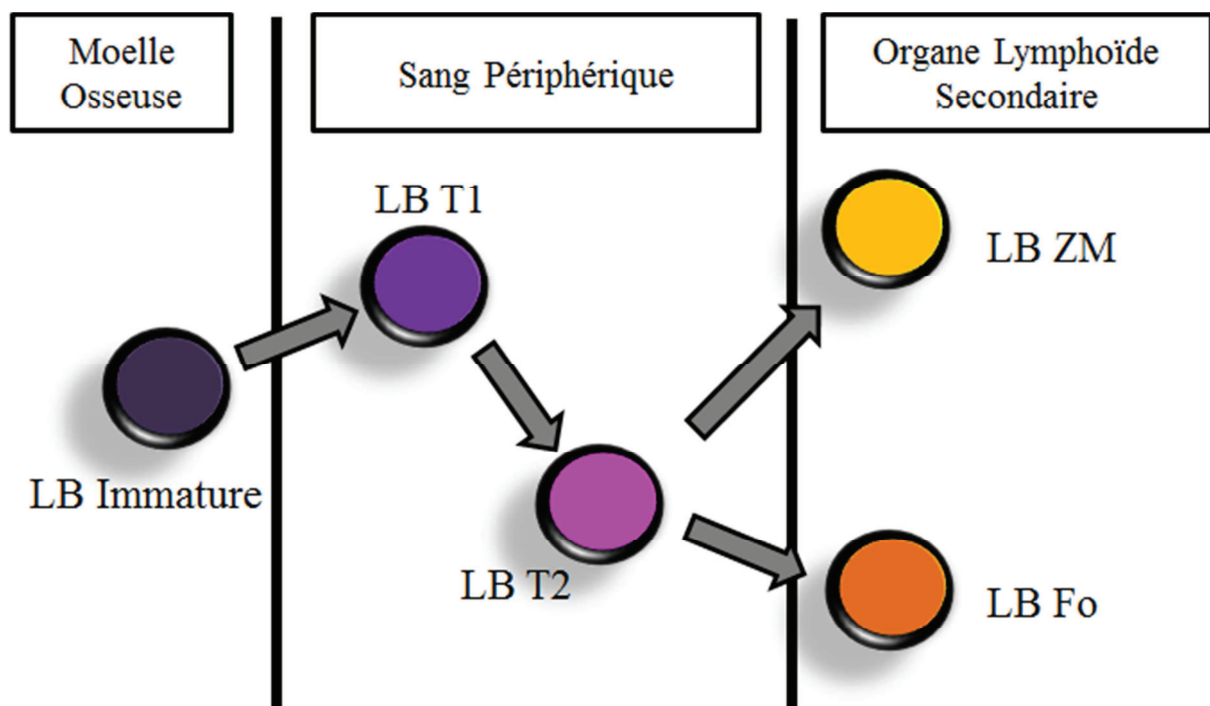
**IL** : Interleukine  
**IMF** : Intensité Moyenne de Fluorescence  
**Kyn** : Kynurénine  
**LB** : Lymphocyte B  
**LB Fo** : Lymphocyte B Folliculaire  
**LB T1 et T2** : Lymphocyte B Transitionnel de type 1 et de type 2  
**LB ZM** : Lymphocyte B de la Zone Marginale  
**LES** : Lupus Erythémateux Systémique  
**LT** : Lymphocyte T  
**LT eff** : Lymphocyte T effecteur  
**MO** : Moelle Osseuse  
**MPA** : Acide MycoPhénolique  
**NK** : Cellule Natural Killer  
**OLII** : Organe Lymphoïde Secondaire  
**OVA** : Ovalbumine  
**PBS** : Phosphate Buffered Saline  
**PC5 et 7** : Phycoérythrine-Cyanine 5 et 7  
**PC** : Plasmocyte  
**PCR** : Réaction de Polymérisation en chaîne  
**PCRq** : Réaction de Polymérisation en chaîne quantitative  
**PD-L1 et L2** : Programmed cell Death 1 Ligand 1 et Ligand 2  
**PE** : PhycoErythrine  
**PFA** : ParaFormAldehyde  
**PR** : Polyarthrite Rhumatoïde  
**PRA** : Panel Reactive Antibodies  
**RAG** : Recombinase Activating Gene  
**Ras-GDP** : Ras GTPase activating protein  
**ROR $\gamma$ t (ou RORc)** : Retinoid-related Orphan Receptor  $\gamma$ T (ou c)  
**RRX** : Rhodamine Red-X  
**RT** : RétroTranscription  
**SAC** : Staphylococcus Aureus Cowan strain I  
**SEP** : Sclérose en plaque  
**SGS** : Syndrome de Gougerot-Sjögren  
**SHP-1** : Src Homology Phosphatase-1  
**ST** : STable  
**STAT** : Signal Transducer and Activator of Transcription  
**Tfh** : Lymphocyte T folliculaire  
**TGF $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
**Th** : Lymphocyte T helper  
**TIM-1** : T-cell Ig Mucin-1  
**TLR** : Toll Like Receptor  
**TLT** : Tissu Lymphoïde Tertiaire  
**TNF $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
**Tr1** : Lymphocyte T régulateur de type 1  
**TRAIL** : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand  
**Treg** : Lymphocyte T régulateur  
**TRITC** : Tetra methyl Rhodamine IsoThioCyanate  
**Trp** : Tryptophane

# **INTRODUCTION**

## I. Le lymphocyte B

### 1. Origine et développement des lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont générés tout au long de la vie, ils naissent dans la moelle osseuse (MO) à partir de cellules souches hématopoïétiques. Le développement de nouveaux lymphocytes B ou ontogénèse B se fait en différentes étapes très complexes afin de répondre au défi représenté par la diversité des antigènes du soi rencontrés tout au long de l'existence. Ainsi, le lymphocyte B va être éduqué et contrôlé à plusieurs stades de son développement dans le but d'élaborer un répertoire lymphocytaire B aussi diversifié que possible. Au cours de sa maturation, le LB passe du statut de LB immature à celui de LB mature naïf, de LB activé, pour se différencier soit en LB mémoire, soit en plasmocyte (PC), cellule sécrétrice d'anticorps (LeBien and Tedder 2008) (figure 1)



**Figure 1. Représentation de l'ontogénèse des lymphocytes B.**

A partir du LB immature dans la moelle osseuse, le lymphocyte B passe par le stade de LB transitionnel de type 1 (LB T1) puis de type 2 (LB T2) afin de donner naissance aux LB matures folliculaires (LB Fo) ou de la zone marginale (LB ZM).

La première étape du développement des LB a lieu dans la moelle osseuse. Cette étape conduit à la production de lymphocytes B, ayant chacun un BCR fonctionnel dont la

spécificité est unique. À la sortie de la MO, le LB immature se différencie rapidement en LB dit transitionnel.

### 1.1. Les lymphocytes B transitionnels

Les LB transitionnels font le lien entre les cellules B immatures de la MO et les cellules B matures périphériques. Ils représentent une étape importante de la maturation B puisque c'est à ce stade que la cellule perd sa sensibilité à la sélection négative par le BCR et devient sensible aux signaux des LT (Chung et al. 2003). Ces cellules transitionnelles possèdent des caractères phénotypiques en commun avec les LB immatures de la MO tels que l'expression du marqueur de surface CD24 ou encore une forte expression de l'IgM de surface. Elles sont aussi caractérisées par une forte expression de la protéine CD38, et peuvent être présentes dans la circulation sanguine ou dans les organes lymphoïdes secondaires (Carsetti et al. 2004). Deux sous-populations de LB transitionnels se distinguent chez l'Homme (Kaminski et al. 2012). Les lymphocytes B transitionnels de type 1 T1 (LB T1) et les lymphocytes B transitionnels de type 2 T2 (LB T2). Le phénotype des LB T1 se rapproche davantage des LB immatures par l'absence d'IgD, de CD23 ou encore de CD21 tandis que les LB T2 sont beaucoup plus proches des LB matures par l'acquisition notamment de l'IgD, du CD21 et du CD23 (Suryani et al. 2010). Il est intéressant de noter que les LB T1 possèdent également le marqueur de surface CD5 (Sims et al. 2005). Les LB T1 ne prolifèrent pas et sont sujets à l'apoptose suite à une stimulation du BCR à l'inverse des LB T2 qui peuvent proliférer et s'avèrent être résistants à l'apoptose (Chung et al. 2003). Les LB progressent du stade T1 au stade T2, et participent ainsi au pool de LB matures dans les organes lymphoïdes secondaires. Au stade LB T2, il existe également un point de contrôle qui permet de restreindre le nombre de LB autoréactifs de 40% à 20% (Wardemann et al. 2003), sous la dépendance d'un facteur de survie spécifique des LB appelé B cell-activating factor belong to TNF family: BAFF. Cette cytokine, qui n'a aucun effet sur les LB T1, participe à l'élimination des LB autoréactifs et favorise la survie des LB T2. En effet, les LB possédant un BCR non-autoréactif expriment fortement le BAFF receptor 3 (Br3), un des récepteurs de BAFF. Ainsi l'engagement du BCR des LB autoréactifs tend à diminuer l'expression de Br3, les rendant moins sensibles à BAFF et diminuant donc leur survie. Les LB T2 qui auront reçu ces signaux pourront ainsi survivre et continuer leur processus de maturation en périphérie. Cette sélection contrôle ainsi le développement des LB en régulant le nombre de LB T2 et

indirectement celui des LB matures, tout en éliminant des LB autoréactifs (Tussiwand et al. 2012).

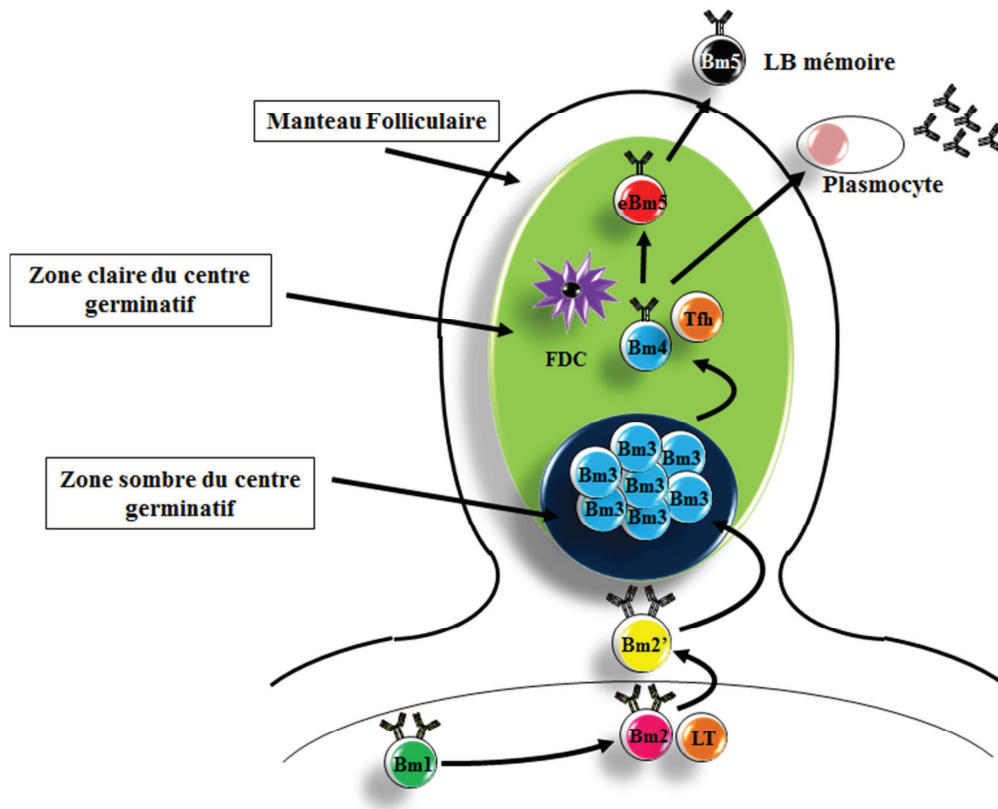
## 1.2. Les lymphocytes B des organes lymphoïdes secondaires

La différenciation en LB mature se fait au niveau des organes lymphoïdes secondaires où deux grands types de LB matures sont retrouvés, les LB folliculaires et les LB de la zone marginale.

### *1.2.1. Les lymphocytes B folliculaires*

Les LB arrivent d'abord dans la zone T extra-folliculaire qui contient de nombreuses cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques (DC) et les macrophages et un réseau de fibres de collagène permettant le passage de chémokines. C'est dans cette zone que le LB pourra recevoir les signaux de costimulation des LT indispensables à la poursuite de sa maturation. Il a été décrit plusieurs stades de maturation au sein des OLII que l'on peut caractériser par des phénotypes très particuliers (Liu and Banchereau 1997) (figure 2).





**Figure 2. Schéma d'un follicule lymphoïde.**

Les différents stades de maturation du LB de son entrée à sa sortie du centre germinatif.

Le LB mature de type 1 (Bm1) est caractérisé par l'expression du BCR IgM/IgD et l'absence de la protéine CD38. Il est considéré comme naïf car il n'a pas encore subi de stimulation antigénique. Lorsque le LB Bm1 rencontre son antigène, il passe au stade activé et exprime entre autre la molécule CD38. C'est le stade Bm2. Les LB activés ou sélectionnés par l'antigène vont ensuite évoluer en LB Bm2' et former un centre germinatif, lieu de la maturation de la réponse humorale. Ces LB Bm2' sont aussi appelés cellules fondatrices du centre germinatif. Les LB entrent alors dans une phase intense de prolifération et forment ainsi la zone dite sombre du GC. Ces LB en forte division cellulaire sont nommés Bm3 (ou centroblastes). Lors de ces nombreuses mitoses les LB Bm3 expriment l'enzyme Activation-Induced (cytidine) Deaminase (AID) et sont le siège de nombreuses mutations au niveau des domaines variables des immunoglobulines. Ce phénomène, appelé hypermutations somatiques participe à l'augmentation de l'affinité du BCR pour son antigène. Les centroblastes se différencient ensuite en LB Bm4 (ou centrocytes) et constituent alors la zone dite claire du GC. A ce niveau, les cellules pourront être testées pour leur affinité pour l'antigène en présence des LT folliculaires (Tfh) et des cellules dendritiques folliculaires (FDC). Une partie de ces LB se différenciera en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. L'autre partie empruntera la voie de la mémoire immunitaire. Ces LB eBm5 (pré-mémoires)

gagneront le manteau du centre germinatif avant de sortir de celui-ci en tant que LB mémoire (Bm5). La sortie du centre germinatif est caractérisée par la perte du marqueur CD38.

### *1.2.2. Les lymphocytes B de la zone marginale*

Chez l'Homme, les LB de la zone marginale sont définis phénotypiquement comme CD21<sup>fort</sup>, CD23<sup>faible</sup>, IgM<sup>fort</sup>, IgD<sup>faible</sup>, CD27<sup>+</sup> et CD1c<sup>fort</sup>. Ces cellules peuvent être parfois retrouvées dans le sang périphérique, ce qui démontre que ces LB seraient capables de recirculer bien que cela soit encore controversé (Weller et al. 2004).

### 1.3. Les lymphocytes B circulants

Les LB issus de la MO et des organes lymphoïdes secondaires peuvent se retrouver dans la circulation sanguine. Ainsi, parmi les LB circulants, il est détecté 60-70% de LB naïfs, 20-30% de LB mémoires et un fort pourcentage de plasmocytes et de LB immatures/transitionnels (Perez-Andres et al. 2010). Concordant avec leur origine de la MO, les LB naïfs et immatures/transitionnels expriment les molécules de surface CD19, CD20, CD22 et CD45. Les LB immatures/transitionnels du sang sont également caractérisés par une forte expression d'IgM et une faible expression d'IgD à l'inverse des LB naïfs. L'expression du CD10 et du CD38 seraient cependant de réels marqueurs présents sur les LB immatures/transitionnels, permettant de les distinguer des LB naïfs. Par ailleurs, les LB mémoires présents dans la circulation sanguine peuvent quant à eux être caractérisés par le marqueur CD27 mais également par l'absence d'IgD et de CD38. Les phénotypes des différentes sous-populations de LB sont indiqués dans le tableau 1. De façon intéressante, l'analyse du compartiment sanguin est un indicateur important de l'état de production des LB et peut être le reflet de pathologies, notamment en transplantation ou dans les maladies autoimmunes (Suryani et al. 2010; Bemark et al. 2012).

Marqueurs	LB immature	LB T1	LB T2	LB ZM	LB Mature
IgM	++	++	+	++	+
IgD	-	-	++	-	+
CD21	-	-	++	++	+
CD23	-	-	++	-	+/-
CD24	++	++	++	-	+
CD38	++	++	++	-	+/-
CD5	+	++	+/-	+	-
CD27	-	-	-	+	+/-
CD1c	-	-	-	++	-

(++) forte expression ; (+) expression moyenne ; (-) non exprimé.

**Tableau 1. Phénotype des LB immatures, transitionnels, des LB de la zone marginale et des LB matures chez l'Homme.**

## **2. Les nombreux rôles du lymphocyte B**

### **2.1. Une cellule productrice d'anticorps**

Les LB ont été d'abord décrits comme des cellules sécrétrices de différents types d'anticorps suite à leur différenciation terminale (Youinou 2007). Les LB de la ZM sont connus pour leur production d'Ac naturels constituant une réponse rapide contre les agents pathogènes au niveau du sang et des muqueuses. Il a été en outre décrit malgré les différents processus de sélection l'existence d'une population de LB autoréactifs circulants (4% des LB matures) qui produisent des auto-anticorps polyréactifs tolérés par le système immunitaire et participant à la réponse immunitaire naturelle (Wardemann et al. 2004).

### **2.2. Une cellule présentatrice d'antigènes**

Les LB peuvent aussi agir comme cellules présentatrices d'antigènes (CPA). De ce fait, les LB sont capables d'internaliser spécifiquement un Ag par leur BCR, de l'apprêter et de présenter efficacement les peptides antigéniques aux LT (Schultz et al. 1990). Cette présentation se fait uniquement lorsque ces peptides antigéniques sont présentés au sein du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II). A cette occasion, les LB peuvent présenter l'antigène et activer les LT. Cette présentation est associée à des liaisons de corécepteurs tels que le CD40 et les molécules de la famille B7, interagissant respectivement sur le LT avec le CD40 ligand (CD40L) et le CD28.

### 2.3. Sécrétion de cytokines et polarisation de la réponse immune

Le LB participe également activement à la réaction immunitaire par sa capacité à sécréter de nombreuses cytokines. Les principales cytokines sécrétées par les LB sont les interleukines 12 (IL-12), 2 (IL-2), l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), le tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) mais aussi l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10 lors d'une stimulation antigénique en présence de lymphocytes T helper de type 1 (Th1) et 2 (Th2) respectivement (Youinou et al. 2009). En effet, il a été montré que les LT Th1 induisent la génération de LB appelés LB effecteurs de type 1 (Be1) caractérisés par la sécrétion d'IFN $\gamma$  et d'IL-2. En présence de LT Th2, ces LB s'orientent plutôt vers un profil de LB effecteurs de type 2 (Be2), qui produisent de l'IL-4 et de l'IL-6. Par ailleurs, la sécrétion d'IL-10, de TGF $\beta$  et de TNF $\alpha$  est similaire à ces deux types de LB. Ces résultats laissent penser que la polarisation du LT imprime une empreinte spécifique aux LB afin de réguler et stabiliser l'environnement dans lequel il se trouve. En outre, il a été démontré de façon très intéressante que, les Be1 et Be2 étaient capables à leur tour d'orienter des LT naïfs Th0 vers un profil Th1 ou Th2. Il est dorénavant clair que les LB sont capables en effet de polariser la réponse immunitaire en participant au maintien de la balance Th1/Th2.

## II. L'émergence du lymphocyte B régulateur

Le système immunitaire protège constamment l'organisme des pathogènes par la mise en place de signaux stimulateurs mais également inhibiteurs. Parmi les acteurs impliqués dans cette régulation négative, les lymphocytes T régulateurs (Tregs) tiennent le premier rôle depuis de nombreuses années, mais le LB est maintenant considéré comme une cellule majeure par son versant régulateur.

### 1. La découverte des lymphocytes B régulateurs

#### 1.1. Dans les modèles animaux

Depuis les années 1970 jusqu'à aujourd'hui, de nombreuses études démontrent l'existence de fonctions régulatrices inhérentes aux LB. En effet, en 1974, deux équipes, celle de Katz et Neta suggèrent pour la première fois l'existence d'un effet suppresseur de pathologies par le LB (Katz et al. 1974; Neta and Salvin 1974). Ces études réalisées sur le cochon d'Inde ont en effet démontré que le transfert adoptif d'une préparation de splénocytes déplétée en lymphocytes B ne permettait pas d'inhiber l'hypersensibilité de contact.

Cependant, ces résultats n'ont pas eu un impact retentissant puisque c'est seulement à la fin des années 90 que le caractère suppresseur des LB a de nouveau refait surface. En 1996, l'équipe de Janeway décrit chez la souris un rôle suppresseur du LB dans l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) (Wolf et al. 1996). En comparant la progression de la maladie entre des souris contrôles et des souris déficientes en LB, cette équipe démontre que l'absence de LB n'a pas d'effet sur l'induction primaire de la maladie, mais en revanche elle diminue sévèrement les rémissions classiquement observées au cours de cette pathologie. L'année suivante, l'équipe de Mizoguchi démontre à son tour dans un modèle de colite intestinale que l'absence de LB aggrave la maladie (Mizoguchi et al. 1997). Un véritable rôle régulateur des LB émerge alors et ne va faire que s'amplifier dans les années suivantes.

Pour la première fois en 2000, une équipe met en évidence un mode d'action pour ces LB suppresseurs. En effet, en évaluant l'influence des LB sur l'activation et la différenciation des LT, l'équipe de Moulin conclut que la production d'IL-10 par les LB est probablement responsable de l'inhibition de la différenciation en Th1 (Moulin et al. 2000). En parallèle, il est démontré que des souris déficientes en LB produisent moins d'IL-10 que les souris sauvages. Toujours chez la souris en 2002, apparaît le terme de B10 pour caractériser les LB sécréteurs d'IL-10. En effet, dans un modèle d'EAE, l'équipe de Fillatreau amène la preuve que la phase de rémission de la maladie est liée à la présence de ces LB producteurs d'IL-10 (Fillatreau et al. 2002). Les auteurs ont démontré que la déficience en B10 chez des souris atteintes de l'EAE induit une réponse pro-inflammatoire de type 1 persistante sans épisodes de rémission. La même année, dans un modèle chronique d'inflammation intestinale murin, l'équipe de Mizoguchi démontre la capacité de LB IL10<sup>+</sup> à empêcher la progression de la maladie par action directe sur la cascade de signalisation des molécules pro-inflammatoires, et ainsi à diminuer la réaction inflammatoire (Mizoguchi et al. 2002). Ces LB qui ont des propriétés régulatrices sont ici pour la première fois appelés lymphocytes B régulateurs (Bregs), appellation, qui perdurera jusqu'à l'heure actuelle

## 1.2. Chez l'Homme

Depuis 2002, les articles étudiant les LB suppresseurs s'enchaînent dans les modèles murins de maladies autoimmunes et c'est en 2007 que la notion de LB régulateur est pour la première fois évoquée chez l'Homme. Dans une étude s'intéressant à des patients souffrant de sclérose en plaques (SEP), les auteurs montrent que ces patients présentent un nombre plus

faible de LB sécréteurs d'IL-10 par rapport à des volontaires sains (Duddy et al. 2007). Ces travaux ont ensuite été confirmés, notamment en 2008 où il a été observé un rétablissement partiel de la maladie chez des patients atteints de SEP, suite à une infection par Helminthes induisant la génération de LB sécréteurs d'IL-10 (Correale et al. 2008). A l'instar des modèles murins, en 2010, il est prouvé que les LB producteurs d'IL-10 sont capables d'inhiber la différenciation Th1 chez des volontaires sains (Blair et al. 2010). En effet, les LB sécréteurs d'IL-10, sous stimulation CD40L et de manière CD80/CD86 dépendante, entraînent ici une diminution des LT  $CD4^+ IFN\gamma^+$  et  $CD4^+ TNF\alpha^+$ . Cette équipe observe en outre l'existence d'un défaut de régulation inhérent aux LB chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique (LES). Ces observations ont été confirmées au sein de notre laboratoire, par la mise en place d'un modèle de coculture LT/LB. En effet, les LB stimulés par le CD40 sont capables ici de moduler la différenciation Th1 grâce à l'interaction CD80-CD86 et à la sécrétion d'IL-10 par les LB (Lemoine et al. 2011). Le défaut de régulation précédemment démontré dans le LES a également été confirmé. Ces résultats récents sont les prémices de l'apogée du LB régulateur chez l'Homme, qui demeure toujours un sujet ouvert à de nombreux débats.

Finalement, la notion de lymphocyte B simple producteur d'anticorps n'est plus d'actualité. De nombreuses études (tableau 2), démontrent désormais une véritable implication du LB dans la régulation du système immunitaire. Cependant, le phénotype et le mode d'action de ces cellules restent encore à éclaircir, particulièrement chez l'Homme où la caractérisation du lymphocyte B régulateur est encore à un stade embryonnaire.

Année	Souris	Homme	Réf
1974	Les LB suppriment l'hypersensibilité de contact		(Katz et al. 1974; Neta and Salvin 1974)
1996	Développement de l'EAE chez la souris déficiente en LB		(Wolf et al. 1996)
1997	Développement de colite intestinale chronique chez la souris déficiente en LB		(Mizoguchi et al. 1997)
2000	Les souris déficientes en LB sécrètent moins d'IL-10		(Moulin et al. 2000)
	Inhibition de la différenciation Th1 par les LB IL-10 <sup>+</sup>		
2002	Apparition de la dénomination « B10 »		(Fillatreau et al. 2002)
2002	Naissance du terme « LB régulateur »		(Mizoguchi et al. 2002)
2007		Les patients atteints de sclérose en plaques ont moins de LB IL-10 <sup>+</sup>	(Duddy et al. 2007)
2008		Rétablissement partiel de patients atteints de sclérose en plaques par induction de LB IL-10 <sup>+</sup> suite à l'infection par Helminthes	(Correale et al. 2008)
2010		Inhibition de la différenciation Th1 par les LB IL-10 <sup>+</sup>	(Blair et al. 2010)

**Tableau 2. La naissance des Bregs chez l'Homme et la souris**

## **2. Phénotype des lymphocytes B régulateurs**

Depuis la découverte des LB régulateurs, leur caractérisation phénotypique fait toujours le travail de nombreuses recherches. Bien qu'initialement la caractéristique majeure permettant d'identifier un LB régulateur fasse référence à sa capacité à sécréter de l'IL-10, il s'est avéré crucial d'identifier des marqueurs de surface additionnels pour définir cette population. En effet, de nombreuses études ont démontré qu'un LB pouvait avoir des fonctions suppressives sans pour autant produire de l'IL-10. Ainsi par exemple, la production de granzyme B (Trapani and Sutton 2003), l'expression de molécules impliquées dans les signaux de mort cellulaire (Fas ligand (FasL), tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) et 2 (PD-L2)) (Lundy 2009), la sécrétion de cytokines immunosuppressives (transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )) ou encore d'anticorps dotés de fonctions immunosuppressives peuvent à eux seuls être des éléments caractérisant un Breg, et ce de manière IL-10 indépendante (Singh et al. 2008; Chen



et al. 2009). Par ailleurs, ces observations montrent la complexité à définir un phénotype unique de Breg, d'une part car les fonctions suppressives exercées semblent s'étayer sur un large panel, et d'autre part car les marqueurs de surface pour les caractériser diffèrent selon les études. Il paraît ainsi possible qu'il n'existe pas un Breg mais plusieurs populations de Bregs.

## 2.1. Phénotype des lymphocytes B régulateurs murins

Initialement, l'équipe de Mizoguchi en 2002 a montré que les LB exprimant un fort niveau de CD1d en réponse à l'inflammation dans un modèle de colite étaient capables de produire de l'IL-10 engendrant ainsi une diminution de la réponse inflammatoire (Mizoguchi et al. 2002). Seules deux populations de la rate ont été décrites exprimant le CD1d: les LB de la zone marginale et leurs précurseurs transitionnels. En 2007, le phénotype des Bregs évolue à l'aide d'un modèle d'arthrite expérimentale où la production d'IL-10 a été attribuée aux LB  $CD19^+ CD21^{fort} CD23^+ CD24^{fort} IgM^{fort} IgD^+ CD1d^{fort}$  avec un phénotype similaire aux LB T2 (Evans et al. 2007). Cependant la même année, l'expression du CD23 est remise en cause par des travaux d'une autre équipe qui définit la population régulatrice B comme provenant de la zone marginale de la rate et exprimant les marqueurs  $CD21^{fort} CD23^{faible}$  (Watanabe et al. 2007). En 2008, l'équipe de Tedder caractérise à son tour le Breg par les marqueurs  $CD19^{fort} CD5^+ CD1d^{fort} IgM^+ CD21^+ CD23^- CD24^{fort} CD93^-$ . Durant la même période, il est mis en évidence dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact une rare population de LB suppresseurs combinant l'expression du CD1d et du CD5. (Matsushita et al. 2008). Le marqueur CD5 est également confirmé la même année dans un modèle d'EAE (Matsushita et al. 2008). L'expression de la molécule CD5 est une donnée très intéressante. En effet depuis 1992, les LB  $CD5^+$  sont connus pour être la principale population capable de sécréter de forte quantité d'IL-10, expliquant ainsi leur pouvoir régulateur (O'Garra et al. 1992). La molécule CD5 a ensuite été décrite comme régulateur négatif de l'activation du BCR via le recrutement de régulateurs négatifs tels que : Src Homology Phosphatase-1 (SHP-1), Ras GTPase activating protein (Ras-GAP), c-Casitas B-lineage lymphoma (c-Cbl) et la caséine kinase 2 (CK2) (Dennehy et al. 1998; Axtell et al. 2006; Demydenko 2010). Sa co-expression avec des molécules impliquées dans la tolérance périphérique souligne également son potentiel régulateur. Les LB  $CD5^+$  expriment en effet de hauts niveaux de FasL et de PD-L2 chez la souris. Ces quelques rôles non exhaustifs confirment qu'il n'est pas surprenant de le retrouver exprimé sur les Bregs.

Cependant, l'hétérogénéité des différents phénotypes mis en évidence montre que l'identification d'un marqueur commun aux Bregs reste à définir afin d'obtenir une caractérisation complète des Bregs. En effet, comme nous avons pu le voir précédemment, la longue liste de modèles utilisés dans l'étude des Bregs peut expliquer les différences phénotypiques observées quant à la caractérisation de ces populations suppressives. Ainsi, l'environnement, qu'il soit pathogène ou non, dans lequel se développe un Breg semble être un des aspects les plus importants à considérer, par le fait notamment des interactions avec les autres cellules et des signaux qu'il reçoit.

Plus récemment semblent émerger de nouveaux marqueurs. Ainsi par exemple, une équipe a démontré qu'une population de LB c-kit<sup>low</sup> Sca-1<sup>low</sup> CD127<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup> CD1d<sup>int</sup> CD43<sup>+</sup> issue de la moelle osseuse possède des propriétés régulatrices. En culture, ces LB stimulés par du CpG inhibent la prolifération des LT et mènent à leur apoptose (Montandon et al. 2013). Cette action inhibitrice se fait grâce notamment au relargage d'IFN $\gamma$  par les LT qui induit une augmentation de l'expression du FasL sur les LB. Le T-cell Ig Mucin-1 (TIM-1), connu comme modulateur de la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs, est également suggéré comme marqueur des Bregs (Ding et al. 2011). En effet, il a été observé un défaut de production d'IL-10 par les Bregs chez des souris mutantes pour TIM-1. De surcroît, ces souris étaient davantage sujettes au développement de maladies autoimmunes, notamment par l'induction d'une hyperactivité des LT et une augmentation de la production d'autoanticorps (Xiao et al. 2012). En 2012, une équipe a également montré l'importance du glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor ligand (GITRL) sur les Bregs. L'expression de ce ligand est ici nécessaire à la prolifération et à la maintenance d'un pool de Tregs en phase de rémission de l'EAE (Ray et al. 2012).

## 2.2. Phénotype des lymphocytes B régulateurs humains

L'identification de LB à potentiel régulateur a aussi été décrite chez l'Homme. Cependant la diversité des résultats ne permet pas d'avoir un phénotype unique permettant leur caractérisation. Il semblerait néanmoins que le phénotype des Bregs humains se rapproche de celui des LB transitionnels CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup> (Blair et al. 2010). En 2011, nous avons également démontré au laboratoire que la population CD19<sup>fort</sup> IgD<sup>+</sup> CD38<sup>fort</sup> CD24<sup>fort</sup> CD5<sup>+</sup>, suite à une stimulation par le CD40 possède des propriétés régulatrices via la sécrétion d'IL-10 (Lemoine et al. 2011). Cette population inhibe la production de TNF $\alpha$  et

d'IFN $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup> de manière IL-10 dépendante. Mais si ces deux équipes se rejoignent sur un phénotype commun des Bregs, d'autres impliquent la molécule CD27. En effet il a été montré que des LB CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> présentent une sécrétion élevée d'IL-10 suite à l'engagement de leur BCR (Bouaziz et al. 2010). Des expériences de coculture avec des LT CD4<sup>+</sup>, en présence de cytidine phosphate guanosine (CpG) et de CD40L démontrent en outre une inhibition de la production d'IFN $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup> de façon IL-10 dépendante (Zha et al. 2012). Il a également été évoqué la présence d'une population CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> spontanément productrice d'IL-10 dans le sang périphérique de volontaires sains (Griffin and Rothstein 2012). Une fois isolée, cette population est capable d'inhiber la production de TNF $\alpha$  par les LT CD4<sup>+</sup> en coculture.

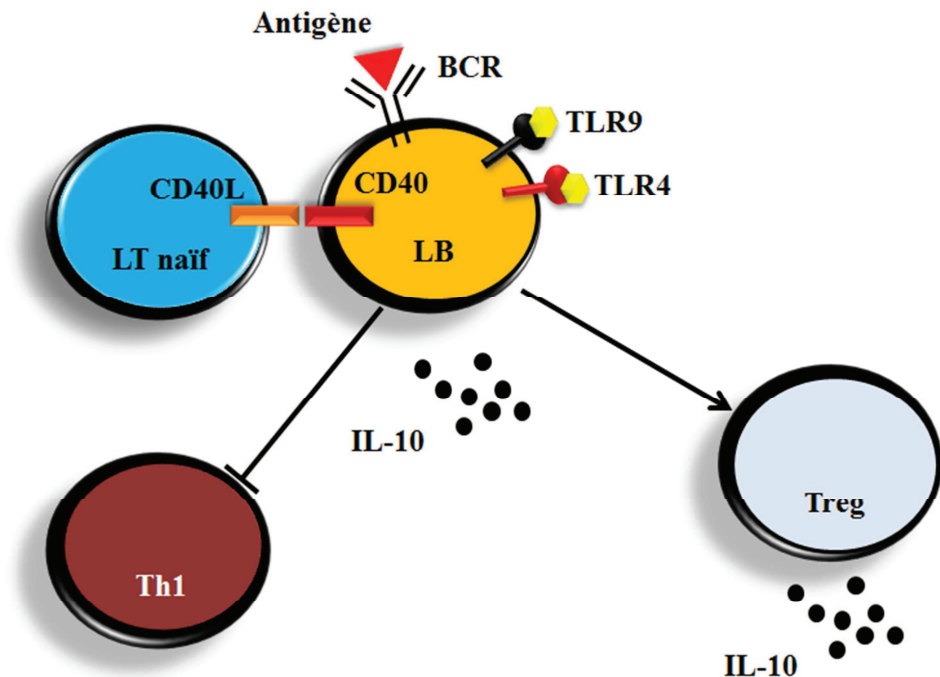
Il semble donc exister chez l'Homme au même titre que chez la souris une très grande variabilité dans les phénotypes observés des LB régulateurs.

### **3. Induction des lymphocytes B régulateurs**

L'induction de la fonction régulatrice dans les LB a été montrée sous la dépendance des trois grandes voies connues d'activation du LB (figure 3):

- La stimulation par CD40 (Lemoine et al. 2011)
- La stimulation du BCR (Tretter et al. 2008)
- La stimulation par les Toll-Like Receptors (TLRs) (Tretter et al. 2008)

Plus récemment l'IL-21 semble jouer un rôle primordial dans la génération de B10 (Yoshizaki et al. 2012).



**Figure 3. Les trois grandes voies impliquées dans la génération des Bregs.**

La stimulation combinée ou non du BCR, du CD40 et des TLRs (4 et 9 chez la souris et seulement le 9 chez l'Homme) conduit à la génération de Bregs. Ces Bregs induits sécrètent de l'IL-10, inhibent la réponse Th1 et favorisent la prolifération de Tregs IL10<sup>+</sup>.

### 3.1. L'interaction CD40/CD40L

Le signal du CD40 semble prépondérant dans la fonction régulatrice des LB. En 2000, dans un modèle de colite intestinale, les auteurs montrent que le transfert de LB traités par un anticorps anti-CD40 bloquant empêche l'effet régulateur de ces LB sur l'infiltration de LT de la Lamina Propria (Mizoguchi et al. 2000). Ces résultats ont été confirmés par la suite dans un modèle murin d'arthrite où l'administration d'un agoniste de l'anti-CD40 améliorait le score de la maladie en inhibant la réponse Th1 *via* la production d'IL-10 (Mauri et al. 2000). L'importance de l'interaction CD40/CD40L dans l'activation des Bregs a également été démontrée chez l'Homme (Lemoine et al. 2011). En effet dans cette étude, l'effet suppresseur des Bregs sur la prolifération des LT est annihilé suite au blocage de ce signal.

### 3.2. L'engagement du BCR

Si le rôle du CD40 est sans doute le mieux compris, cette molécule n'est pas la seule à avoir été impliquée dans le développement des Bregs. En effet, la première étude suggérant l'implication du BCR dans l'induction des Bregs remonte à 2007 (Watanabe et al. 2007). Dans un modèle d'hypersensibilité de contact, les souris CD19<sup>-/-</sup> présentent une pathologie

bien plus sévère que les souris sauvages, caractérisée par une augmentation des infiltrats de LT CD8<sup>+</sup>. Cette déficience en CD19 induit en parallèle une forte augmentation de la sécrétion d'IFN $\gamma$  sur le lieu de l'inflammation, corrélée à une diminution de l'IL-10. L'absence ici du CD19 ne permet donc pas au BCR de fonctionner correctement, et suggère un rôle du BCR dans l'induction des Bregs. Cette observation a été confirmée dans un modèle d'EAE notamment où les auteurs démontrent que l'expression du CD19 est directement liée à la production d'IL-10 et que l'absence de CD19 sur les LB provoque l'exacerbation de la maladie (Matsushita et al. 2008).

Chez l'Homme, en 2008, il a été démontré que des LB CD25<sup>+</sup> activés par un superantigène, le *Staphylococcus aureus* Cowan strain I (SAC), sont capables d'inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> (Tretter et al. 2008). Plus récemment, il a été observé une augmentation du niveau d'IL-10 chez des patients atteints d'hépatite B chronique, corrélée à une augmentation de la charge virale (Das et al. 2012). De plus, ces patients possèdent davantage de LB CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD28<sup>fort</sup> sécréteurs d'IL-10 qui suppriment la réponse LT CD8<sup>+</sup> antivirale.

### 3.3. La voie des TLRs

L'autre voie d'activation impliquée dans le développement des Bregs est la voie des TLRs. Les LB murins expriment tous les TLRs (TLR1-9) (Barr et al. 2007) alors que chez l'Homme, seuls les TLRs 1,2,6-10 sont présents (Browne 2012). L'importance des TLRs dans les Bregs a pris vie en 2001 dans un modèle de diabète autoimmun quand des chercheurs ont démontré que le transfert adoptif de LB activés par du lipopolysaccharide (LPS), ligand du TLR4, diminuait la réponse Th1 conduisant ainsi à prévenir l'apparition de la maladie (Tian et al. 2001). Enfin, le TLR le plus étudié reste le TLR9, dont son ligand, le CpG, est majoritairement utilisé pour générer des Bregs. Une stimulation *in vitro* du TLR9 de LB spléniques chez la souris résulte en une forte production d'IL-10. Cette sécrétion d'IL-10 a été confirmée par d'autres équipes chez la souris (Gray et al. 2007; Blair et al. 2009).

L'implication des TLR4 et 9 dans l'activation des Bregs est bien décrite chez la souris, mais la transposition à l'Homme est loin d'être aussi claire. Ainsi, l'absence de TLR4 sur les LB humains rend difficilement transposable les conclusions observées chez la souris. En revanche il a été montré que des LB humains activés par le TLR9 sont capables d'inhiber la

prolifération des LT ainsi que leur production d'IFN $\gamma$  en coculture notamment par la production d'IL-10 (Tretter et al. 2008).

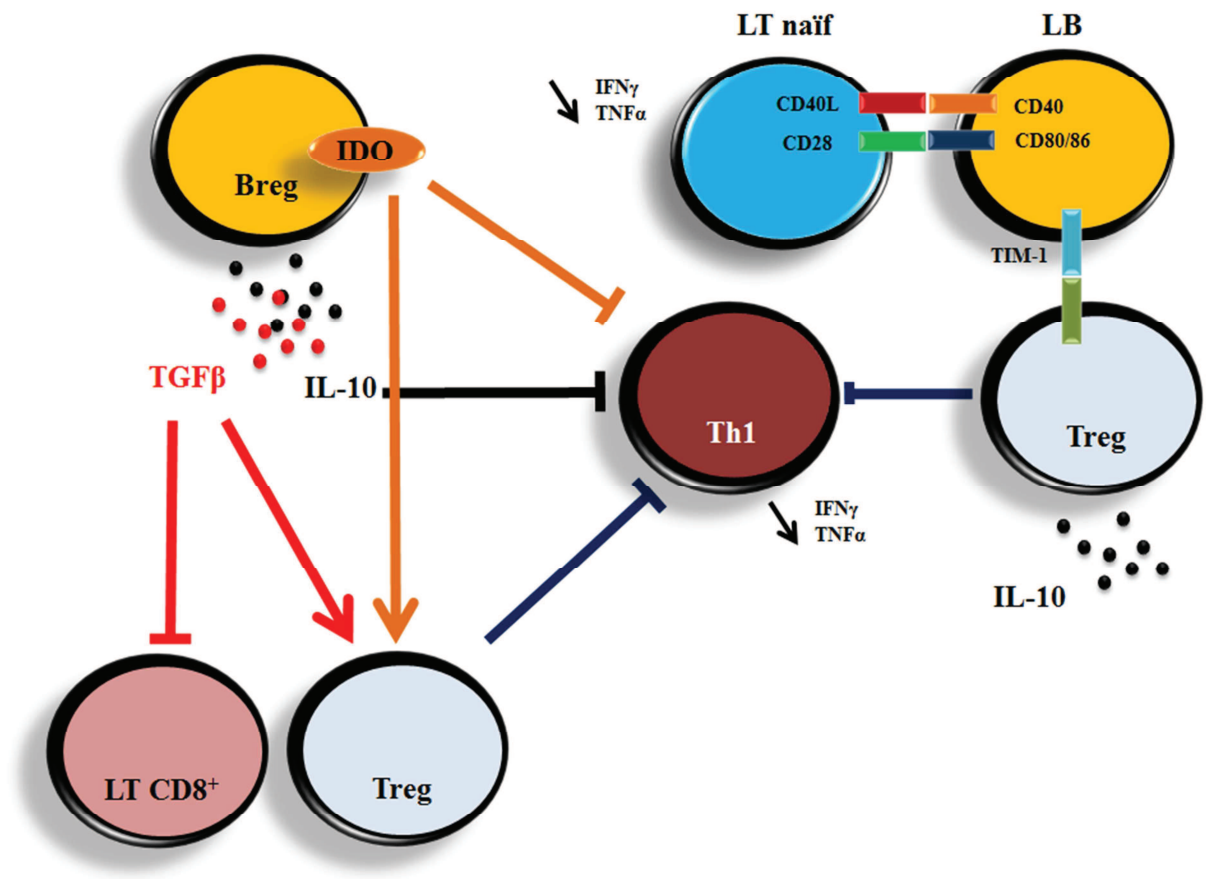
### 3.4. L'IL21

L'implication récente de l'IL-21R présent à la surface du LB est aussi à souligner dans le développement des Bregs et pourrait conduire à de nouvelles perspectives dans la compréhension des Bregs. En effet, une équipe a démontré chez la souris, qu'une stimulation du CD40 couplée à celle de l'IL-21R conduit au développement et à l'expansion de LB IL10<sup>+</sup> (Yoshizaki et al. 2012). Lorsque ces LB sont ensuite transférés chez une souris ayant développé l'EAE, une diminution des symptômes est alors observée, confirmant que ces Bregs sont bien fonctionnels. Dans l'environnement tumoral chez l'Homme, une autre équipe a mis en évidence la colocalisation de LB exprimant le granzyme B et de Tregs sécrétant d'IL-21 (Lindner et al. 2013). Une analyse plus approfondie sur des LB du sang périphérique de volontaires sains leur a permis de montrer en culture que l'IL-21, combinée à une stimulation du BCR et du TLR7 ou 9, induit la sécrétion du granzyme B dans le LB, le granzyme B pouvant ensuite inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup>.

Finalement, il ne semble pas exister de potion magique exclusive pour activer des Bregs, et ces différents résultats soulignent qu'il reste encore bien des choses à découvrir quant aux mécanismes d'activation des Bregs. Cependant il paraît légitime de penser que la génération des Bregs n'est pas le résultat d'une seule voie, mais plutôt sous la dépendance d'une variabilité importante de signaux. Ces différents modes d'activation pourraient être d'ailleurs à l'origine des différences notables dans l'observation des phénotypes des Bregs.

## 4. Mécanismes d'action des lymphocytes B régulateurs

Les Bregs jouent un rôle suppresseur durant la réponse immune, l'inflammation ou encore les infections (Bouaziz et al. 2008; DiLillo et al. 2010) (figure 4).



**Figure 4. Les mécanismes d'action des Bregs.**

Les Bregs mettent en place leurs fonctions régulatrices aussi bien par la sécrétion de facteurs solubles que par contact cellule-cellule. L'IL-10, le TGFβ et IDO sont les trois principales molécules relarguées par les Bregs et impliquées dans la régulation de la réponse immune. Cette régulation est aussi exercée par le contact CD40 et l'expression des molécules co-stimulatrices CD80/CD86 du LB avec le LT, inhibant la prolifération des LT ainsi que la réponse Th1. L'expression de TIM-1 par le LB mène quant à elle à la génération de Tregs Foxp3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>.

#### 4.1. Régulation par sécrétion de facteurs solubles

Les LB sont capables de sécréter un vaste panel de cytokines (Harris et al. 2000). Les LB producteurs de cytokines ont d'abord été classés selon leur fonction effectrice, soit Be1 soit Be2. Avec la découverte des Bregs, il apparaît évident que la sécrétion de cytokines par les LB ne se limite pas à cette dichotomie dans l'immunité.

##### 4.1.1. L'IL-10

Nous avons vu précédemment que l'IL-10 est une des caractéristiques importantes de la définition des Bregs. Par ailleurs, jouant un rôle dans le contrôle de l'immunité, il n'est pas surprenant que cette cytokine soit impliquée dans presque tous les modèles murins d'étude



des Bregs. Ainsi, des LB sécréteurs d'IL-10 sont retrouvés dans les modèles d'EAE (Fillatreau et al. 2002; Lampropoulou et al. 2008), de colite intestinale (Mizoguchi et al. 2002; Sugimoto et al. 2007), d'arthrite induite par le collagène (Mauri et al. 2003; Evans et al. 2007), de lupus (Lenert et al. 2005; Blair et al. 2009), de diabète, (Hussain and Delovitch 2007) mais aussi dans des modèles étudiant la transplantation (Rowe et al. 2006), l'infection par des parasites (Gillan et al. 2005; Correale et al. 2008) et l'immunité anti-cancéreuse (Inoue et al. 2006; Olkhanud et al. 2011).

Cette cytokine aux propriétés anti-inflammatoires peut agir sur différents types cellulaires et induire la suppression de leurs fonctions. Dans une revue générale de 2003, Asadullah a résumé les différentes cibles de cette cytokine et ses effets (Asadullah et al. 2003). En particulier, l'IL-10 a un effet supprimeur sur les CPA et les LT. Ainsi, sur les CPA, l'IL-10 a un effet inhibiteur de leur fonction de présentation d'antigènes (de Waal Malefyt et al. 1991) et sur la sécrétion de cytokines nécessaires à la polarisation des LT comme l'IL-12 (Skok et al. 1999). Sur les LT, l'IL-10 a un effet inhibiteur direct sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Del Prete et al. 1993). Initialement associée aux Th2 et décrite comme responsable de l'inhibition de la production de cytokines Th1, il s'avère que l'IL-10 peut également prévenir la réponse Th2 (Cottrez et al. 2000). En effet, après sensibilisation de souris à l'ovalbumine (OVA), la mise en culture de LT CD4<sup>+</sup> purifiés en présence d'OVA et de splénocytes irradiés, conduit à une forte augmentation de la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10, reflétant une polarisation T de type Th2. Le transfert de lymphocytes T régulateurs de type (Tr1), sécréteurs d'IL-10, au moment de la sensibilisation à l'OVA chez la souris inhibe cette polarisation Th2 au cours de la culture *in vitro*. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle inhibiteur de l'IL-10 sur la différenciation Th2.

L'IL-10 a donc un effet pléiotrope inhibiteur sur l'ensemble de la réponse inflammatoire. Cependant il paraît utopique de définir l'IL-10 comme cytokine jouant uniquement un rôle inhibiteur. En effet, des études dans le cancer ont montrées que l'IL-10 peut favoriser l'immunité anti-tumorale en activant les LT CD8<sup>+</sup> et les cellules natural killer (NK) (Fujii et al. 2001; Mocellin et al. 2005). De plus, la surexpression d'IL-10 après une opération chirurgicale peut conduire à de graves complications infectieuses alors qu'il lui est reconnu des effets protecteurs contre l'infection (Woiciechowsky et al. 1998; Oberholzer et al. 2002). Dans le contexte du LB, l'IL-10 agit de différentes manières. Ainsi, cette cytokine peut par exemple prévenir l'apoptose des LB, stimuler leur prolifération, leur différenciation ainsi

que leur expression du CMH II (Go et al. 1990; Levy and Brouet 1994). Au vu de ces informations, l'IL-10 n'a donc pas seulement une action immunosuppressive mais peut jouer de nombreux rôles en fonction de l'environnement dans lequel elle est sécrétée.

#### *4.1.2. Le TGFβ*

Cependant, l'IL-10 n'est pas la seule cytokine sécrétée par les Bregs. En effet, d'autres facteurs solubles ont été identifiés dans le mécanisme de régulation. Ainsi, une étude a montré que la stimulation de LB par le TLR4 induisait une anergie des LT CD8<sup>+</sup> en coculture. Les LB suppresseurs sont ici caractérisés par leur sécrétion d'IL-10 et de TGFβ (Parekh et al. 2003). Dans cette étude c'est le TGFβ qui est responsable de l'effet observé. Cette différence peut s'expliquer ici par la cible des LB qui est différente. En effet, la majeure partie des études sur les Bregs se concentre sur les LT CD4<sup>+</sup>, alors qu'ici ce sont les LT CD8<sup>+</sup> qui sont étudiés. La production de TGFβ par le LB a également été soulignée dans un modèle d'allergie comme cytokine pouvant conduire à l'induction de Tregs qui expriment le Forkhead box p3(Foxp3). Il a été démontré que le TGFβ sécrété par les LB induisait la conversion de LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> effecteurs en Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Singh et al. 2008).

#### 4.2. Régulation par l'enzyme IDO

D'après de récentes études, il paraît évident que les LB puissent également sécréter une enzyme : l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Johnson et al. 2010; Godin-Ethier et al. 2011). C'est une enzyme intracellulaire impliquée dans le catabolisme du tryptophane (Trp), générant à cette occasion de nombreux métabolites. Initialement, son rôle premier a été décrit comme antimicrobien, par consommation du tryptophane, acide aminé essentiel aux cellules dans l'environnement inflammatoire. Hors depuis peu, de nouvelles découvertes ont montré l'importance de cette enzyme dans l'immunité adaptative, notamment dans les maladies autoimmunes, le cancer ou la transplantation (Munn and Mellor 2012). L'induction d'IDO est bien connue dans les cellules dendritiques et se fait par le biais de deux cytokines, l'IFNγ ou le TGFβ. Une récente découverte a décrit IDO comme une protéine de signalisation pouvant induire la notion de tolérance suite à son activation par le TGFβ (Pallotta et al. 2011). Sachant qu'IDO est exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques, la question de sa présence dans les cellules B est évoquée. Cette hypothèse est notamment fondée sur la description d'une population de cellules dendritiques avec des attributs de cellules lymphoïdes B exprimant IDO chez la souris (Johnson et al. 2010). Bien

qu'IDO soit relativement bien caractérisée dans les modèles murins, les connaissances chez l'Homme ne sont pas claires. En effet, IDO est exprimée par une grande variété de cellules comme les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, des cellules tumorales ou encore plus récemment les LB, après stimulation par IFN $\gamma$  et CD40L, mais dans des LB inactifs (Godin-Ethier et al. 2011).

#### 4.3. Régulation par contact cellulaire

La sécrétion de facteurs solubles semble être un élément majeur dans la fonction des Bregs, mais d'autres mécanismes faisant intervenir des molécules membranaires existent conjointement afin d'assurer leur fonction.

##### 4.3.1. La molécule CD40

Le CD40 est certainement la molécule la plus étudiée dans le mécanisme d'action des Bregs. Présentée précédemment comme essentielle à l'induction des Bregs, cette molécule joue également un rôle important dans la mise en place de la régulation du LB. La première étude laissant supposer un rôle fonctionnel du CD40 remonte à 2000 (Mizoguchi et al. 2000), où il a été montré que les LB inhibent la prolifération des LT dans un modèle de colite intestinale. L'étude du mécanisme par lequel les LB inhibent la prolifération des LT révèle un rôle du CD40 dans la régulation. En effet, le blocage de cette molécule par un anticorps bloquant inhibe la régulation exercée par les LB. Il n'est pas exclu cependant que le blocage de cette molécule inhibe l'induction de Bregs et non leur propre mécanisme d'action. Cette observation a été confirmée chez l'Homme où le fait de bloquer la voie CD40/CD40L empêche la régulation du LB de se mettre en place (Lemoine et al. 2011).

##### 4.3.2. Les molécules CD80 et le CD86

L'importance des molécules CD80 et CD86 sur le LB a également été démontrée. Ces deux molécules costimulatrices sont notamment impliquées en phase de rémission de l'EAE (Mann et al. 2007). L'effet bénéfique sur l'EAE est ici observé sur des souris irradiées, après reconstitution en LB exprimant CD86, mais pas nécessairement CD80. De plus, dans un modèle de colite intestinale, les LB inhibent la prolifération des LT, *via* notamment le CD86 (Mizoguchi et al. 2000). Cette même observation a été faite chez l'Homme où la modulation de la différenciation Th1 résulte en partie de l'interaction CD80-CD86 (Lemoine et al. 2011).

Cependant ces résultats sont controversés, car une équipe a évoqué que le blocage de l'une ou l'autre de ces molécules n'a pas d'incidence sur la régulation du LB (Lemoine et al. 2011).

#### *4.3.3. Les autres molécules*

Chez la souris, de nouvelles molécules font leur apparition chez les Bregs. La molécule TIM-1 connue pour être impliquée dans la régulation de la réponse immune par le LT (de Souza and Kane 2006; Hafler and Kuchroo 2008) a récemment été identifiée sur le LB (Umetsu et al. 2005; Wong et al. 2010). En 2011, elle a ensuite été décrite sur les LB sécréteurs d'IL-10, en particulier les LB CD1d<sup>fort</sup> CD5<sup>+</sup> chez la souris (Ding et al. 2011). Ces Bregs TIM-1<sup>+</sup> sont de forts producteurs d'IL-4 et d'IL-10 suite à une stimulation par un anti-TIM-1 et induisent des Tregs IL-10<sup>+</sup>. En 2012, il a ensuite été observé un défaut de production d'IL-10 par les Bregs chez des souris mutantes pour TIM-1, ce qui les rendait davantage susceptibles aux problèmes autoimmuns (Xiao et al. 2012). Bien que TIM-1 commence à être bien décrit dans le LB chez la souris, la présence de cette molécule chez l'Homme reste à étudier.

#### 4.4. Régulation par induction de lymphocytes T régulateurs

Il est probable que les Bregs entretiennent une relation privilégiée avec les Tregs. Ainsi, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'influence des Bregs sur les Tregs. Le premier indice important tient compte du fait que les Bregs sont décrits comme sécrétant de l'IL-10 et du TGFβ. Hors ces deux cytokines, en plus de leur fonction anti-inflammatoire directe sont décrites comme favorisant la différenciation des LT en Tregs (Roncarolo et al. 2001; Weiner 2001; Chen et al. 2003).

C'est en 2007 que sera établi le lien entre Bregs et Tregs par Mann (Mann et al. 2007). Les auteurs montrent ici que les LB, par l'intermédiaire de l'interaction B7-CD28, contrôlent une population de Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> producteur d'IL10 ayant un rôle suppresseur dans l'EAE. Puis en 2010, le lien entre la sécrétion d'IL-10 par les LB et l'induction de Tregs sera établi pour la première fois (Amu et al. 2010). En effet, dans un modèle d'asthme, l'infection des souris par un parasite conduit à la génération d'une population de LB IL10<sup>+</sup>. Par ailleurs, le transfert de ces LB IL10<sup>+</sup> dans des souris sensibilisées à l'OVA et soumise à de l'OVA par aérosol, induit la protection contre l'asthme. À l'aide d'une souris Foxp3-eGFP dont le gène de Foxp3 est lié à une protéine fluorescente Green Fluorescent Protein (GFP), ils

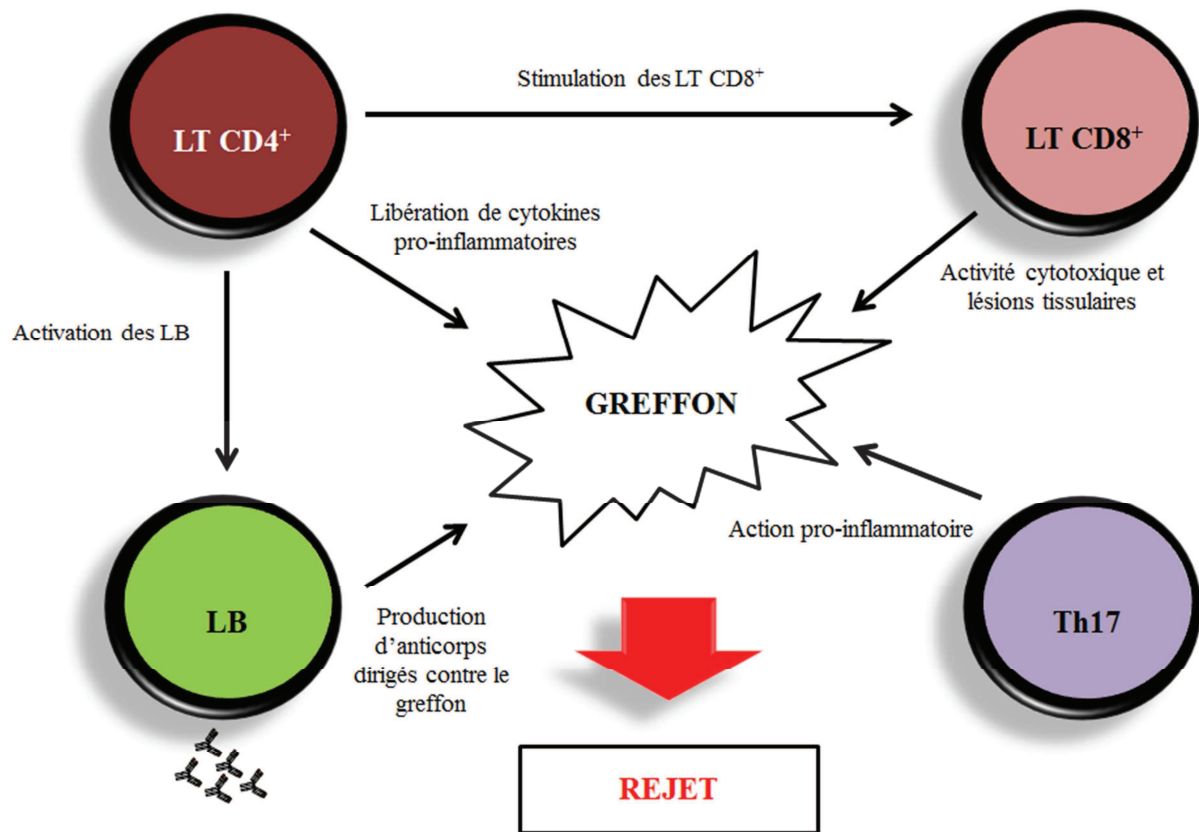
démontrent ensuite que la population de LB producteurs d'IL-10 est corrélée à l'évolution d'une population  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ . L'année suivante, une autre équipe démontrera également l'implication du TGF $\beta$  secrété par les LB dans l'induction de Tregs dans un modèle murin de cancer du sein 4T1 (Olkhanud et al. 2011). En effet, les LB producteurs de TGF $\beta$  induits par les cellules tumorales sont capables ici de convertir des LT  $CD4^+ CD25^-$  en Tregs  $CD4^+ Foxp3^+$ .

### **III. La transplantation rénale**

La transplantation rénale est devenue le traitement de choix de l'insuffisance chronique terminale, avec des taux de survie du greffon à un an atteignant 90 à 95% selon les équipes. Cependant, malgré les progrès considérables réalisés, aussi bien dans les techniques chirurgicales que dans l'utilisation de thérapeutiques immunosuppressives, le rejet d'allogreffe demeure un obstacle en transplantation rénale où il représente un taux d'environ 15% à un an (Cohen et al. 2006).

#### **1. Mécanismes immunologiques du rejet**

Bien que l'immunité innée initie le rejet d'allogreffe par des mécanismes faisant intervenir les voies des TLRs (Goldstein 2006; Nogueira et al. 2009), l'immunité adaptative prend le relai et intervient dans la reconnaissance de l'alloantigène, l'activation des LT, l'infiltration du greffon et l'agression des cellules parenchymateuses (figure 5).



**Figure 5. Représentation simplifiée des mécanismes immunologiques du rejet de greffe.**

Les LT CD4<sup>+</sup> participent au rejet du greffon directement par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou indirectement *via* l'activation de LT CD8<sup>+</sup> et de LB. Les Th17 jouent également un rôle dans le rejet comme acteur de l'inflammation locale.

### 1.1. La reconnaissance allogénique

Trois voies de reconnaissance sont actuellement connues (Jiang et al. 2004). Dans la présentation directe, les cellules dendritiques activées du donneur migrent vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur et présentent les alloantigènes du donneur aux lymphocytes T du receveur. Ce sont principalement les cellules dendritiques du greffon qui jouent le rôle de CPA et déclenchent la réaction d'allogreffe. Cette présentation directe représente 90 à 95% de l'intensité de la réaction allogénique et explique la fréquence des épisodes de rejet aigu cellulaire durant la période post-greffe précoce. La présentation indirecte remplace progressivement la présentation directe (Gokmen et al. 2008). Elle peut être responsable de rejets aigus mais elle est surtout impliquée dans le rejet chronique. Une

troisième voie de présentation, dite semi-directe, découverte plus tardivement (Herrera et al. 2004), stipule que les cellules dendritiques du receveur sont capables de capturer et de présenter les molécules du CMH du donneur, à partir des cellules endothéliales du greffon.

## 1.2. Activation des lymphocytes T

### *1.2.1. Activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>*

L'activation des LT CD4<sup>+</sup> conduit à leur prolifération clonale et à la synthèse de cytokines qui agissent directement ou indirectement sur les cellules effectrices (LB, LT CD8<sup>+</sup>, macrophages, cellules NK) intervenant dans la destruction du tissu cible.

### *1.2.2. Activation des lymphocytes Th17*

Les Th17 dont la fonction première est d'assurer la défense de l'organisme contre les pathogènes extracellulaires sont impliqués dans le rejet, en particulier par la sécrétion d'IL-17. L'IL-17 induit la transcription de gènes codant pour des cytokines, des chémokines, des facteurs de croissance ou encore des protéines aux propriétés antimicrobiennes. Etant donné la très large répartition du récepteur à l'IL-17 à travers l'organisme, cette cytokine possède une multitude d'actions biologiques sur de nombreuses cibles cellulaires. Ainsi chez la souris, suite à une greffe rénale, le blocage de l'IL-17 permet une réduction importante de l'infiltrat inflammatoire du greffon (Li et al. 2010). Dans ce contexte, l'IL-17 induit la production secondaire de chémokines (chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) et 2 (CXCL2)) capables de recruter d'autres leucocytes. Le blocage de l'IL-17 permet donc ici de neutraliser ce mécanisme chimiotactique. Par ailleurs, dans un modèle de greffe de cœur, la liaison de l'IL-17 sur son récepteur à la surface de cellules dendritiques immatures favorise l'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation optimisant ainsi la présentation des alloantigènes et la sensibilisation des lymphocytes alloréactifs (Antonysamy et al. 1999). Enfin, une autre facette du rôle joué par l'IL-17 dans le rejet chronique a été illustrée chez la souris. Après une greffe cardiaque et déplétion des LT CD4<sup>+</sup>, la fibrose progressive est prévenue par l'administration d'un anticorps neutralisant l'IL-17 (Diaz et al. 2009). Cependant, il a également été montré que les Th17 induisent d'importants dommages tissulaires, indépendamment de la sécrétion d'IL-17, dans un modèle de rejet de greffe de peau. Ces lésions seraient notamment dues à l'infiltration massive de neutrophiles recrutés par les Th17 (Agorogiannis et al. 2012).

Chez l'Homme, le rôle des Th17 dans le rejet de greffe a également été démontré. En effet, des taux significatifs d'IL-17 ont été retrouvés dans les biopsies rénales et les urines durant le rejet aigu de greffe rénale (Van Kooten et al. 1998; Loong et al. 2002). De même, des concentrations sériques anormalement élevées d'IL-17 ont été mesurées chez des patients présentant un rejet aigu de greffe hépatique ou pulmonaire (Benghiat et al. 2009). D'autres travaux sur des greffons rénaux détransplantés ont établi une corrélation étroite entre la présence de Th17 et la courte durée de vie du greffon (Deteix et al. 2010). Les Th17 incriminés produisaient de l'IL-21 qui stimule la néogénèse de centres germinatifs ectopiques au sein de l'interstitium rénal.

### *1.2.3. Mécanismes de destruction tissulaire via les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>*

L'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (CTL) peut se faire de façon directe par la cellule cible ou indirecte par l'intermédiaire des LT CD4<sup>+</sup> activés. La destruction des cellules parenchymateuses par les CTL se fait par au moins deux mécanismes complémentaires. Le premier consiste en la libération de perforines qui se fixent sur la membrane de la cellule cible pour former un pore membranaire. Les granzymes pénètrent alors dans la cellule cible *via* ce pore et induisent une fragmentation de l'ADN. L'autre implique la liaison de la protéine Fas de la cellule cible avec son ligand FasL situé sur le LT CD8<sup>+</sup>, entraînant un signal de mort cellulaire. Les deux mécanismes se font par le biais de l'activation de la voie des caspases et se terminent par la mort de la cellule cible par apoptose.

## **2. Les différents types de rejet**

Les mécanismes de l'immunité innée et adaptative sont impliqués dans le rejet d'allogreffe (Land 2007; Samstein 2007). L'attaque immunitaire induit des lésions au sein du tissu greffé, lésions qui se traduisent par une altération à court et/ou à moyen terme de la fonction rénale. On peut distinguer quatre types principaux de rejet :

- le rejet hyperaigu, lié à la présence d'anticorps anti-human leucocyte antigen (HLA) lymphocytotoxiques dirigés contre le greffon, préexistants à la transplantation, et responsables alors d'un rejet immédiat dès le déclampage des vaisseaux. Ce type de rejet est devenu exceptionnel depuis la réalisation systématique du crossmatch avant la transplantation rénale.



- le rejet aigu humoral, lié à l'apparition d'anticorps spécifiques du donneur appelés donor specific antibody (DSA).
- le rejet aigu cellulaire, lié principalement à une réaction cellulaire lymphocytaire T.
- le rejet humoral chronique actif, dont le mécanisme fait intervenir les anticorps.

En 1991, la Classification de Banff, élaborée par un comité d'experts internationaux réunis dans la ville de Banff au Canada, permet de décrire des lésions élémentaires histologiques des rejets aigus et chroniques (Solez et al. 1993). Depuis cette première réunion, tous les 2 ans, les médecins impliqués dans la pathologie de la transplantation se réunissent pour discuter et standardiser les lésions de façon à classer les différents types de rejet et établir des éléments pronostiques.

Dans notre étude, nous nous intéresserons au rejet cellulaire aigu (ACR) et au rejet humoral chronique (cABMR).

## 2.1. Le rejet cellulaire aigu

L'incidence actuelle du rejet cellulaire aigu est peu élevée (moins de 10%). Devant l'amélioration des thérapies immunosuppressives ciblant essentiellement les LT, le rejet cellulaire n'est actuellement plus un problème de perte de greffon. Cliniquement, les patients présentent généralement une dégradation de la fonction rénale pauci ou asymptomatique. Le diagnostic se fait grâce à la biopsie rénale. La classification de Banff de 2007 décrit de manière précise les rejets cellulaires impliquant principalement les LT. Le rejet aigu est gradué en 5 grades de gravité croissante, définie par l'importance de l'infiltrat cellulaire interstitiel, la sévérité de la tubulite et de l'artérite. La richesse en plasmocytes des infiltrats de certains rejets cellulaires est en général un élément de mauvais pronostic, témoignant probablement d'une composante humorale associée. Le rejet aigu survient généralement dans les trois ou quatre premiers mois après la transplantation, avec un pic de fréquence le premier mois. Il est dû à la reconnaissance des Ag du donneur par les LT du receveur. Son mécanisme relève d'une cytotoxicité cellulaire et humorale. Les lymphocytes du receveur s'activent, prolifèrent et attaquent les cellules du greffon, soit directement, soit par l'intermédiaire d'Ac. Le risque de rejet aigu, bien que plus faible après quelques mois, persiste pendant toute la durée de fonctionnement du greffon.

## 2.2. Le rejet humoral chronique

Le rejet humoral chronique est décrit en 2007 (Solez et al. 2007). La membrane basale des glomérules présente des doubles contours, il existe une fibrose interstitielle et une atrophie tubulaire (FIAT). Le marquage C4d, témoin d'un conflit entre un anticorps et un antigène sur le greffon, est toujours positif et les patients possèdent des DSA. Les lésions sont alors irréversibles. La physiopathologie du rejet humoral chronique est mal connue. L'histoire naturelle du rejet humoral chronique n'est pour l'instant qu'hypothétique. Après la transplantation, un certain nombre de patients, pour des raisons qui restent à déterminer, et ce malgré le traitement immunosuppresseur, vont développer des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur. A un stade ultérieur, ces anticorps vont entraîner le dépôt de C4d sur la biopsie rénale. A ce stade, il n'y a encore pas de lésions histologiques ni de manifestations cliniques. On considère qu'ensuite, il pourrait y avoir deux évolutions possibles. La première conduirait à un phénomène d'accommodation avec une stabilité et l'absence d'évolution vers un rejet humoral chronique proprement dit. La deuxième conduirait quant à elle au rejet humoral chronique avec l'installation progressive de lésions histologiques et une élévation de la créatininémie, témoin d'une dysfonction du greffon. Cette hypothèse a l'intérêt de formaliser une sorte de continuum débutant par une rupture au niveau du contrôle immunologique conduisant à la production d'anticorps anti-HLA et ensuite une cascade d'événements qui sont éventuellement encore évitables jusqu'au rejet humoral chronique.

L'enjeu actuel est donc de repérer les patients à risque de rejet, notamment de rejet humoral, avant l'engagement du système immunitaire dans un processus pouvant être irréversible et corrélé à l'installation de lésions histologiques définitives. Mieux comprendre la physiopathologie de ces rejets est donc indispensable afin de prévenir ces rejets humoraux chroniques.

## 3. Le lymphocyte B en transplantation

L'importance du LB dans les mécanismes immunologiques de rejet provient de deux évidences : la part de plus en plus reconnue de la composante humorale de certains rejets et en particulier du rejet chronique, et le rôle propre du lymphocyte B dans la régulation du système immunitaire. Récemment, l'utilisation de nouveaux outils a permis de préciser ce phénomène et de confirmer que 10 à 30% des rejets aigus ont une composante humorale et que le rejet humoral chronique est une des causes majeures de perte de greffon. Ainsi, les LB pourraient

donc jouer un rôle, actuellement sous-estimé et mal connu, dans la réponse allogénique. De plus, jusqu'à récemment, le rôle du LB en transplantation se confinait à une réaction inflammatoire par la production d'anticorps, la présentation antigénique et la sécrétion de cytokines (Zarkhin et al. 2010). Cependant, à l'instar des LT, le LB est maintenant reconnu comme ayant deux fonctions principales en immunité, soit comme cellule pro-inflammatoire, soit comme cellule régulatrice (Mauri and Blair 2010)

### 3.1. Lymphocyte B et rejet

#### 3.1.1. *Anticorps anti-HLA*

L'implication des anticorps anti-HLA du receveur dans le rejet de greffe a été le premier indice permettant d'impliquer les LB dans le rejet (Hume et al. 1955; Starzl et al. 1964; Williams et al. 1968). En 1969, il est ainsi reporté pour la première fois une association entre les anticorps anti-HLA de classe I après transplantation rénale chez l'Homme et le rejet de greffe (Morris et al. 1969). La corrélation entre la présence de DSA, des anticorps dirigés contre les molécules HLA du donneur, et le rejet chronique a été confirmée chez l'Homme dans des patients greffés du rein (Jeannet et al. 1970). Il est maintenant établi que la présence de DSA dans l'allogreffe participe au rejet aigu et au rejet humoral, en attaquant l'endothélium de l'allogreffe, conduisant inéluctablement à diminuer la survie du greffon (Terasaki et al. 2007; Colvin et al. 2010).

#### 3.1.2. *Les centres germinatifs ectopiques*

Aujourd'hui, l'implication du LB dans le rejet cellulaire aigu et humoral chronique est acceptée (Zarkhin et al. 2008; Zarkhin et al. 2010). En effet, la présence de denses infiltrats de LB sur des biopsies rénales d'allogreffes est associée à un mauvais pronostic (Sarwal et al. 2003). De nombreuses équipes ont également démontré la formation d'agrégats de LB au sein même de l'allogreffe dans des modèles animaux de transplantation et chez l'Homme. En effet, les LB sont capables de former avec les LT et les DC présents, un infiltrat inflammatoire appelé tissu lymphoïde tertiaire (TLT). Dans un modèle de rejet chronique après une greffe aortique chez le rat par exemple, il a été observé le développement de TLT un mois après la transplantation (Thaunat et al. 2010). Chez l'homme, l'analyse de greffons rénaux explantés après un rejet chronique a également démontré l'existence de ces structures (Thaunat et al. 2010). Il a été suggéré en outre que les LB présents au sein de ces TLT seraient à l'origine d'un programme de néogenèse dépendant du microenvironnement. Les LB ont également la

capacité d'activer les LT présents au pourtour des centres germinatifs ectopiques, contribuant ainsi à amplifier la réponse immune intragreffe. Bien que ces structures s'apparentent à des organes lymphoïdes secondaires, on peut noter quelques différences (Thaumat 2012). En effet, *a contrario* des organes lymphoïdes secondaires, de larges quantités de cytokines Th17 et de facteurs de croissance sont retrouvées dans les TLT. De plus, il y existe également une libération massive de néoantigènes piégés par le greffon du fait d'un défaut dans le drainage lymphatique.

Par ailleurs, si les TLT sont liés au rejet chronique, il est aussi proposé que ces structures puissent être régulatrices sous certaines conditions, permettant une survie prolongée de l'allogreffe. Ainsi, dans un modèle tolérant de greffe rénale murin, l'organisation des LB en TLT est corrélée à un effet bénéfique sur la fonction et la survie du greffon (Brown et al. 2011). Nous pouvons imaginer que la présence de TLT régulateur chez l'Homme existe également (Thaumat 2011). En conclusion, le greffon n'est donc pas seulement la cible d'une réponse alloimmune exacerbée mais il est aussi le berceau d'une réponse immune intense.

### 3.2. Lymphocyte B et tolérance

Bien que la formation intragreffe d'un compartiment B soit associée généralement à la destruction du greffon dans le rejet cellulaire aigu et humoral chronique (Thaumat et al. 2008; Zarkhin et al. 2008; Thaumat et al. 2010), certains auteurs soulignent le fait que ces LB pourraient être à l'origine de la tolérance au greffon (Brown et al. 2011).

#### 3.2.1. Le lymphocyte B dans les modèles animaux de tolérance

Chez l'animal, l'induction de la tolérance est notamment associée à une accumulation de LB au sein de l'allogreffe (Le Texier et al. 2011). L'importance du LB dans la mise en place de la tolérance a également été soulignée dans un modèle murin tolérant de greffe cardiaque (Lal et al. 2011). En effet ici, la déplétion en LB lors de la transplantation conduit à l'abrogation de cette tolérance. De manière intéressante, une équipe a montré que l'établissement de cette tolérance est indépendant de l'IL-10 (Chen et al. 2011). Afin de le démontrer, les auteurs ont ici reconstitués la moelle osseuse de souris tolérantes greffées du cœur, de telle sorte que les LT et les LB soient défaillants pour l'IL-10. Il s'avère qu'en absence d'IL-10, la tolérance est maintenue. Par ailleurs, ces données ont été confortées à l'aide d'un modèle tolérant de greffe rénale (Chen and Jensen 2007). Une équipe a en effet

montré que la formation d'un cluster B au sein de l'organe transplanté est associée à la présence de Tregs Foxp3<sup>+</sup>. Il en résulte ainsi en une augmentation de la survie d'un greffon fonctionnel à plus long terme. Ces résultats suggèrent que les LB permettraient ainsi l'expansion de Treg CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>.

### ***3.2.2. Le lymphocyte B et la tolérance chez l'Homme***

La notion de tolérance a pu être étudiée chez l'Homme au cours de la greffe rénale grâce à l'existence d'une cohorte de patients décrits comme « opérationnellement tolérants ». La définition de cet état de tolérance opérationnelle est basée sur la stabilité et la qualité de la fonction rénale plusieurs années après interruption du traitement immunosuppresseur (Brouard et al. 2005). Dans une première étude américaine d'une cohorte de patients tolérants, l'analyse du compartiment sanguin par microarray a révélé la présence d'un niveau élevé de transcrits associés aux LB (Newell et al. 2010). L'analyse plus fine a montré une différence d'expression de 30 gènes en comparaison avec un groupe de patients stables, dont 22 étaient spécifiques des LB et se retrouvaient surexprimés chez les patients tolérants. L'étude de cette cohorte a également permis de montrer une augmentation du nombre absolu de LB circulants et plus particulièrement de LB naïfs et de LB transitionnels. Cette étude a également été confortée par une autre équipe chez de nouveaux patients tolérants (Sagoo et al. 2010), renforçant l'hypothèse que les LB participeraient au maintien de la tolérance. L'étude de la cohorte française a également confirmé l'augmentation en nombre et en fréquence des LB chez des patients tolérants (Pallier et al. 2010). Dans cette étude, il a été constaté une augmentation du nombre de LB activés mémoires. L'analyse phénotypique plus précise a montré que ces LB possèdent un profil inhibiteur exprimant notamment le CD1d et le CD5. Associé à ce profil inhibiteur, il a été retrouvé une surexpression du corécepteur négatif du BCR, CD32b et du régulateur transcriptionnel Bank. En outre, l'analyse *in vitro* de la capacité de ces LB à sécréter de l'IL-10 n'a montré aucune différence significative d'expression de cette cytokine entre les LB de patients tolérants et ceux issus de patients stables. Enfin dans une étude plus récente et à l'inverse de ce qui a précédemment été décrit, il est montré que les patients opérationnellement tolérants présentent un nombre de LB circulants, naïfs, mémoires et transitionnels similaire à celui de volontaires sains (Silva et al. 2012). Par ailleurs, l'analyse de la phosphorylation du signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) après stimulation par un anticorps anti-CD40, montre que les LB transitionnels des patients tolérants ont ici une forte capacité à activer la voie de signalisation CD40/STAT3. Ce signal

entraîne leur sécrétion d'IL-10. Il est également intéressant de noter que les LB transitionnels des patients ayant développé un rejet chronique sont trois fois moins sensibles à cette activation. Ainsi, ces récentes découvertes tendent à démontrer que LB semble intimement lié au développement de la tolérance au greffon.

#### IV. Problématique

En transplantation rénale chez l'Homme, la plupart des protocoles mis en place dans la lutte contre le rejet sont dirigés contre les LT. Cependant, au vu des éléments précédemment décrits, il est évident que le LB joue un rôle majeur lors des phénomènes de rejet. Ainsi, s'il est souligné sa capacité à engendrer une réponse immune contre le greffon, il est également admis que le LB participe à l'acquisition de la tolérance à l'allogreffe. Il semble ainsi exister une balance entre LB pro-inflammatoires et LB régulateurs, dont l'équilibre est en partie influencé par les traitements immunosuppresseurs. Cependant, si certains patients tolèrent leur greffon pendant plusieurs années, d'autres présentent des épisodes de rejet, aigus ou chroniques, dans lesquels le rôle du LB reste à approfondir.

Au cours de ce travail de thèse, **l'objectif principal a donc été de chercher à caractériser et à identifier le rôle du LB dans les différents types de rejet**, en particulier dans le rejet humoral chronique et le rejet cellulaire aigu.

Les études réalisées dans le domaine de la transplantation soulignent l'importance des LB transitionnels CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup> dans la tolérance à l'allogreffe. De plus, il est admis que les LB mémoires participent activement au rejet, par leur importante sécrétion d'anticorps dirigés contre le donneur et leur forte capacité à activer la réponse T. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons décidé de caractériser phénotypiquement les LB du sang périphérique de patients qui ont développé un rejet. Ces résultats ont été comparés à ceux observés chez deux populations contrôles : des patients greffés avec une fonction rénale stable ainsi que des volontaires sains. Nous avons ainsi réalisé une étude des différentes sous-populations de LB circulantes par cytométrie en flux à partir de sang frais. Nous avons également caractérisé les populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> retrouvées dans le sang périphérique des différents groupes.

Cette étude phénotypique a été couplée à une étude fonctionnelle des LB des patients greffés. En effet, dans notre laboratoire, nous avons également démontré dans des études antérieures, la capacité du LB à inhiber la prolifération des LT, ainsi que leur différenciation en Th1 par l'induction de Tregs. En s'appuyant sur ces observations, nous avons ainsi mis en place un modèle *in vitro* de coculture LT/LB adapté aux patients greffés. Ce modèle nous a permis de vérifier la capacité régulatrice des LB issus des différents patients ayant développé un rejet. Nous avons donc isolé des LT et des LB de patients greffés et évalué l'impact de ces LB sur le contrôle de la prolifération des LT. Nous avons ensuite cherché à détailler les mécanismes régulateurs au sein des cocultures LT/LB. Nous nous sommes intéressés à la sécrétion de cytokines régulatrices telles que l'IL-10 et le TGF $\beta$ , à l'induction de Tregs et à une enzyme immunosuppressive, l'indoleamine 2,3-dioxygénase.

Il a également été suggéré une importante infiltration de LB au sein même du greffon lors du rejet cellulaire. Cependant, il existe peu de données quant à la nature de ces LB infiltrant. Ainsi, disposant de biopsies de patients ayant développé un rejet cellulaire aigu et grâce notamment aux compétences de notre laboratoire dans le domaine de la microscopie confocale sur le LB, nous avons cherché dans un deuxième travail à identifier et à caractériser les infiltrats de LB sur des coupes de biopsies de ces patients.

Enfin, de nombreuses études associent le rejet cellulaire aigu à la présence de Th17. En revanche, il existe très peu de travaux qui étudient le rôle du LB sur la population Th17. Afin de répondre à cette question, nous avons développé un modèle *in vitro* de différenciation des LT en Th17 à partir de LT CD4<sup>+</sup> périphériques isolés. Afin d'évaluer le rôle du LB, nous avons ensuite réalisé des cocultures LT/LB et analysé l'évolution des marqueurs caractéristiques des Th17 pour vérifier s'il existe une régulation B sur cette population. L'attrait principal de ce dernier point étant ensuite d'apprécier l'influence des LB de patients qui développent un rejet cellulaire sur la population Th17.

## **RESULTATS**



**LE LYMPHOCYTE B DANS LE  
REJET HUMORAL CHRONIQUE  
PRESENTE UNE DISTRIBUTION  
ANORMALE ET UNE  
ALTERATION DE SES  
FONCTIONS SUPPRESSIVES**

## **I. Introduction**

En transplantation rénale, la composition du compartiment B est maintenant perçue comme un élément important dans le rejet. En effet, tandis que les LB naïfs ou transitionnels sont associés à une meilleure survie du greffon et impliqués dans la tolérance opérationnelle, les LB mémoires quant à eux sont plutôt liés au rejet (Newell et al. 2010; Pallier et al. 2010; Burns and Chong 2011). Le rejet humoral chronique (cABMR), principal complication suite à la transplantation, représente un challenge intéressant dans l'optique de déterminer l'impact du LB sur la survie à long terme du greffon.

Afin d'identifier les sous-populations de LB présentes dans le sang périphérique lors du rejet humoral chronique et d'en apprécier leur fréquence, nous avons procédé à l'analyse phénotypique du compartiment B et T par cytométrie en flux. Cette analyse a été ensuite comparée à la distribution des différents types cellulaires dans deux groupes contrôles : des patients présentant une fonction rénale stable et des volontaires sains. Comme nous allons le voir, cette étude a permis de mettre en évidence des différences de distribution des sous-populations de LB entre les trois groupes analysés.

Nous nous sommes ensuite posé la question de l'impact de cette différence phénotypique sur la fonction du LB et en particulier sur sa capacité à réguler les réponses lymphocytaires T. Pour ce faire, nous avons mis en place un modèle de coculture LT/LB dans lequel nous avons souhaité analyser l'effet de la présence des LB sur la prolifération des LT autologues, ainsi que sur leur capacité sécrétrice des cytokines Th1 (IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ). Ces travaux font l'objet de l'article n°2 intitulé « B-cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody mediated rejection » actuellement en révision à *Kidney International*.

## **II. MATERIEL ET METHODES**

### **1. Groupe d'étude**

Nous avons étudié deux groupes de patients transplantés rénaux. Tous les patients et les volontaires sains inclus dans l'étude ont donné leur consentement éclairé et font partie d'un cadre éthique défini par l'établissement hospitalo-universitaire de Brest.

Les critères d'inclusion établis pour le groupe **de patients stables (ST)** sont les suivants:

- Les patients sont greffés depuis au moins un an et n'ont pas présenté d'épisode de rejet. Leur fonction rénale est stable et leur protéinurie est inférieure à 0,5g/24h.

- De plus, leur biopsie à un an ne présente pas de lésions histologiques, notamment pas de signes de rejet ni de glomérulopathie d'allogreffe. Le marquage C4d des capillaires péri-tubulaires est négatif.

- Enfin, il s'agit de patients faiblement immunisés : PRA (Panel Reactive Antibodies) inférieur à 10%. La détection des DSA par Luminex (One Lambda Inc., Caroga Park, CA, USA) est également négative.

Les caractéristiques cliniques et immunologiques de ces patients sont décrites dans les tableaux 4 et 6.

Les patients inclus dans le groupe **de rejet humoral chronique (cABMR)** présentent une dysfonction rénale perçue par une augmentation de la créatinémie et de la protéinurie. En accord avec la classification de Banff, ces patients développent des DSA évalués par Luminex et toutes leurs biopsies présentent une glomérulopathie d'allogreffe (doublement des contours de la membrane basale) et une capillarite péri-tubulaire. Conformément à la dernière réunion de Banff en 2011, nous n'avons pas retenu le marquage C4d comme un critère de sélection. Toutes les données cliniques et immunologiques de ce groupe sont répertoriées dans les tableaux 5 et 6.

L'immunisation a été évaluée chez tous les patients avant transplantation par deux méthodes : un test de lymphocytotoxicité permettant la mise en évidence des anticorps anti-HLA de classe I et une technique plus sensible de cytométrie en flux appelée Luminex® *via* des kits de 96 billes (classe I) et 76 billes (classe II), qui permet de dépister les Ac de classe I et 2. Ces tests permettent de quantifier l'immunisation par un pourcentage (PRA) correspondant au pourcentage de cellules ou billes du panel reconnues par les anticorps du patient. Une forte sensibilité chez le receveur est définie par un PRA supérieur à 85%.

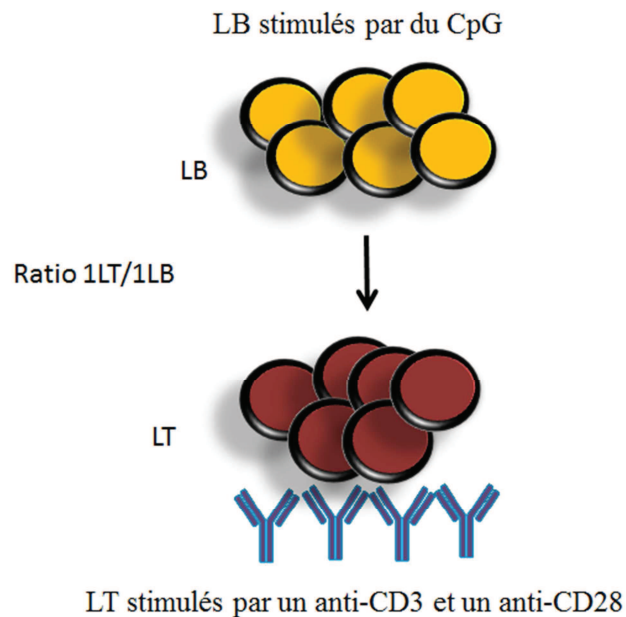
## 2. Culture cellulaire

### 2.1. Isolation des cellules à partir du sang périphérique

Le sang périphérique du groupe contrôle est obtenu à partir de volontaires sains du laboratoire. Les échantillons sanguins des contrôles, des patients ST et cABMR ont été collectés et dilués de moitié avant d'être déposés sur Ficoll-Hypaque. Après centrifugation, les cellules mononucléées sont récupérées dans l'anneau, lavées en HBSS puis comptées. Ces cellules sont ensuite incubées avec des globules rouges de mouton traités à la neuraminidase avant une nouvelle centrifugation sur Ficoll-Hypaque. Après lyse des globules rouges, les LT sont isolés et les LB sont purifiés à l'aide du kit *Human B cell enrichment kit without CD43 depletion* Easy Step (StemCell Technologies). Les cellules ainsi isolées présentent une pureté supérieure à 95% pour les LB et supérieure à 98% pour les LT.

### 2.2. Conditions de culture cellulaire

Les LT isolés du sang périphérique de volontaires sains et de patients sont cultivés en plaque 96 puits, préalablement coatée avec une IgG de chèvre anti-souris (Jackson ImmunoResearch) à 10 µg/mL, à une concentration finale de  $4.10^4$  cellules/mL pendant 3 à 5 jours. Les LT sont stimulés par un anti-CD3 (Biolegend, CA) à 0,2 µg/mL et un anti-CD28 (Beckman Coulter) à 0,2 µg/mL. Pour les expériences de coculture, les LB sont ajoutés à un ratio 1 :1. Les LB sont en outre stimulés par du CpG ODN de type B n°2006 (Invivogen, San Diego, CA/USA) préparé à une concentration finale de 0,25 µM (figure 6).



**Figure 6. Représentation schématique du modèle de coculture.**

Les LT et les LB isolés du sang périphérique de volontaires sains et de patients sont cultivés en plaque 96 pendant 3 à 5 jours. Les LT sont stimulés par un anti-CD3 à 0,2 µg/mL et un anti-CD28 à 0,2 µg/mL. Les LB sont ajoutés à un ratio 1 :1. Les LB sont stimulés par du CpG ODN de type B n°2006, préparé à une concentration finale de 0,25 µM.

### 3. Etude de la prolifération

L'utilisation du carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) permet d'évaluer la prolifération des LT. La fluorescence des cellules au repos est stable au cours du temps. Lorsque les cellules se divisent, le CFSE se répartit uniformément entre les deux cellules filles qui sont donc deux fois moins fluorescentes que la cellule mère. Ainsi, chaque division successive se traduit par la réduction d'un facteur deux de l'intensité de la fluorescence cellulaire. Cette diminution est appréciée par cytométrie.

Les LT fraîchement isolés sont ainsi mis en suspension dans du phosphate buffered saline (PBS)-bovine sérum albumin (BSA) (Sigma) 0,1% puis incubés avec du CFSE à 5µM pendant 5min à 4°C dans l'obscurité. Après un lavage, le marquage est contrôlé et les cellules sont mises en culture. La prolifération des LT est évaluée par cytométrie en flux sur un FC500 (Beckman Coulter) par mesure de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du CFSE. En coculture, les cellules sont marquées par un anticorps anti-CD19 PC7 (Beckman Coulter) et le CFSE est analysé sur les cellules négatives pour le CD19.

#### 4. Dosage des cytokines

Les surnageants de culture ont été collectés et les particules résiduelles ont été éliminées par centrifugation. Des kits commerciaux ont permis de mesurer l'IFN $\gamma$  (Beckman Coulter) et le TNF $\alpha$  (Beckman Coulter). Les différents ELISA ont été réalisés selon les instructions fournies.

#### 5. Cytométrie en flux et tri

##### 5.1. Phénotypage des cellules

Afin d'étudier l'expression des marqueurs de surface sur les LB, l'analyse par cytométrie a été réalisée sur du sang frais obtenu durant les visites de routine des patients et également lors des cocultures cellulaires. Tous les anticorps utilisés sont indiqués dans le tableau 3.

Anticorps	Spécificité	Hôte	Conjugué	Isotype	Fournisseurs
Anti-CD27	Homme	Souris	PE	IgG1	Beckman Coulter
Anti-IgD	Homme	Souris	FITC	IgG1	BD Biosciences
Anti-CD24	Homme	Souris	PE	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD5	Homme	Souris	FITC	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD38	Homme	Souris	PC5	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD19	Homme	Souris	PC7	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD19	Homme	Souris	PC5	IgG1	Beckman Coulter
Anti-HLA-DR	Homme	Souris	PC7	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD4	Homme	Souris	PC7	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD8	Homme	Souris	PC5	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD45RA	Homme	Souris	FITC	IgG1	Beckman Coulter

*FITC : Isothiocyanate de fluorescéine ; PE : Phycoérythrine ; PC5 : Phycoérythrine-cyanine-5 ; PC7 : Phycoérythrine-cyanine-7.*

**Tableau 3. Anticorps utilisés en cytométrie.**

##### 5.2. Tri cellulaire

Les tris cellulaires de sous-populations de LB sont réalisés sur un cytomètre de flux EPICS ELITE (Beckman Coulter). Les différents tris de LB sont effectués à partir de LB de sang périphérique.

Les LB transitionnels et matures sont triés à l'aide des marqueurs CD19, CD5, CD24 et CD38. Les LB transitionnels sont identifiés comme CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup> alors que les LB matures comme CD19<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>. Les LB transitionnels sont également séparés en deux populations : les LB CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup> CD5<sup>-</sup> et les LB CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup> CD5<sup>+</sup>. Les LB Bm2, Bm2', eBm5 et Bm5 sont quant à eux triés grâce à trois marqueurs membranaires : CD19, CD38 et IgD. Les LB Bm2 et Bm2' sont CD19<sup>+</sup> CD38<sup>+/fort</sup> et IgD<sup>+</sup> tandis que les LB eBm5 et Bm5 sont CD19<sup>+</sup> CD38<sup>-/faible</sup> IgD<sup>-</sup>.

Les LB mémoires sont triés en LB dits « pré-switch » et « post-switch » selon l'expression des marqueurs CD19, CD27 et IgD. Les LB « pré-switch » sont identifiés comme CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> et les LB « post-switch » CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>.

Après chaque tri, la pureté des cellules triées est supérieure ou égale à 95%.

## **6. Analyses statistiques**

Les données statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5, en utilisant soit le test non paramétrique Mann-Whitney, soit le t-test apparié, et exprimées par l'erreur standard de la moyenne. Lorsque  $p < 0,05$ , la différence est considérée comme significative.

**Tableau 4. Caractéristiques immunologiques des patients stables (ST)**

Patient	Néphropathie Initiale	Transplantation Antérieure (n)	Rejet cellulaire antérieur	Thérapie d'induction	Délai depuis la transplantation (mois)	Traitement d'entretien	DSA	Biopsie
ST1	HSF	0	Non	IL2R	13	Cyclo/Cs/MPA	Non	Oui
ST 2	NTIC	0	Non	IL2R	17	Tacro/MPA	Non	Oui
ST3	IgA	0	Non	Non	12	Tacro/Cs/MPA	Non	Oui
ST4	Alport	0	Non	Non	15	Tacro/MPA	Non	Oui
ST 5	ANCA	0	Non	IL2R	12	Tacro/MPA	Non	Oui
ST6	PKD	0	Non	IL2R	20	Tacro/MPA	Non	Oui
ST7	HSF	0	Non	IL2R	30	Tacro/Cs/MPA	Non	Oui
ST8	PKD	0	Non	IL2R	20	Tacro/MPA	Non	Oui
ST 9	Inconnue	0	Non	Non	14	Tacro/Cs/MPA	Non	Oui
ST 10	Inconnue	0	Non	IL2R	36	Cyclo/Cs/MPA	Non	Oui
ST 11	Inconnue	0	Non	IL2R	12	Tacro/MPA	Non	Oui
ST12	Inconnue	0	Non	IL2R	12	Cyclo/MPA	Non	Oui
ST13	ANCA	0	Non	IL2R	12	Cyclo/MPA	Non	Oui
ST14	IgA	0	Non	IL2R	14	Cyclo/MPA	Non	Oui
ST 15	Inconnue	0	Non	IL2R	12	Cyclo/Cs/MPA	Non	Oui
ST16	Vasculaire	0	Non	IL2R	14	mTORi/Cs	Non	Oui
ST17	Inconnue	0	Non	IL2R	14	Tacro/Cs/MPA	Non	Oui
ST18	Inconnue	0	Non	IL2R	15	mTORi/Cs/MPA	Non	Oui
ST19	IgA	0	Non	IL2R	126	Cyclo/Cs/MPA	Non	Non
ST20	Goodpasture	0	Non	Thymo	124	Tacro	Non	Non
ST21	Alport	0	Non	IL2R	60	Tacro/MPA	Non	Non
ST22	IgA	0	Non	IL2R	145	Cyclo/MPA	Non	Non
ST23	IgA	0	Non	IL2R	63	Cyclo/Cs/MPA	Non	Non
ST24	ANCA	0	Non	IL2R	61	Cyclo/Cs	Non	Non
ST25	PKD	0	Non	IL2R	48	Belatacept/Cs/MPA	Non	Non
ST26	IgA	0	Non	IL2R	92	Cyclo/Cs/MPA	Non	Non
ST27	Vasculaire	0	Non	IL2R	66	Cyclo/Cs/MPA	Non	Non

Cs : corticostéroïdes ; Cyclo : cyclosporine ; DSA : anticorps spécifiques du donneur ; HSF : Hyalinose segmentaire et focale ; IgA : néphropathie à IgA ; IL2R : anticorps anti-IL2 récepteur ; MPA : Acide Mycophénolique ; mTORi : inhibiteurs de mTOR ; Vasculaire : Néphropathie vasculaire ; NTIC : Néphropathie tubulointerstitielle chronique ; PKD : Polykystose hépato-rénale autosomique dominante ; Tacro : tacrolimus ; Thymo : thymoglobulines.



**Tableau 5. Caractéristiques immunologiques des patients ayant développé un rejet humoral chronique (cABMR)**

Patient	Néphropathie Initiale	Transplantation Antérieure (n)	Rejet cellulaire antérieur	Thérapie d'induction	Temps depuis la transplantation (mois)	Traitement d'entretien	DSA classe 1	DSA classe 2	Classification BANFF	C4d
cABMR 1	PKD	0	Non	IL2R	36	mTORi/Cs/MPA	0	DR15 (9000) DQ7 (19932)	g1cg2cpt3	pos
cABMR 2	Goodpasture	2	Non	Thymo	30	Tacro/Cs/MPA	0	DP9 (4000)	g0cg2cpt3	pos
cABMR3	Dysplasie	0	Non	Non	171	Cyclo/Cs/MPA	B44 (7649) B62 (4027)	DQ5 (16590) DQ3 (16385)	g1cg2cpt2	pos
cABMR4	IgA	0	Oui	Non	69	mTORi/Cs/MPA	A24 (7476)	0	g3cg2cpt1	neg
cABMR 5	PKD	0	Oui	Thymo	108	Tacro/Cs/MPA	0	DQ3 (12178)	g2cg1cpt1	pos
cABMR 6	IgA	0	Non	Thymo	21	Tacro/Cs/MPA	0	DQ4 (14348)	g2cg2pt2	pos
cABMR 7	Dysplasie	2	Non	Thymo	20	Tacro/Cs/MPA	0	DP4 (4000)	g2cg3cpt2	pos
cABMR 8	IgA	0	Oui	IL2R	156	Tacro/Cs/MPA	A1 (3275)	0	g1cg1cpt2	pos
cABMR 9	IgA	0	Non	IL2R	89	Tacro/Cs/MPA	0	DQ2 (11500)	g2cg2cpt2	pos
cABMR 10	Inconnue	0	Non	IL2R	144	Cyclo/MPA	A29 (2425)	0	g2cg3cpt2	neg
cABMR 11	Dysplasie	2	Non	Thymo	41	Tacro/Cs/MPA	0	DQ3 (7307)	g2cg3cpt2	neg
cABMR 12	Inconnue	1	Non	IL2R	57	Tacro/Cs/MPA	0	DQ6 (4000)	g3cg2cpt3	neg
cABMR 13	IgA	0	Non	Thymo	156	Cyclo/MPA	0	DQ6 (9773)	g3cg2cpt3	pos
cABMR 14	Inconnue	1	Non	Thymo	44	Tacro/Cs/MPA	0	DP9 (1944)	g1cg3cpt3	pos
cABMR 15	Inconnue	0	Non	Thymo	60	Tacro/Cs/MPA	0	DR17 (2115)	g3cg3cpt0	neg
cABMR 16	Inconnue	0	Non	Thymo	216	Tacro/Cs/MPA	0	DQ5 (6720)	g3cg3cpt3	pos
cABMR 17	IgA	1	Oui	Thymo	234	Cyclo/Cs/MPA	0	DQ5 (5699)	g3cg3cpt0	neg

Thymo : thymoglobulines ; Tacro : tacrolimus ; Cs : corticostéroïdes ; Cyclo : cyclosporine ; PKD : Polykystose hépato-rénale autosomique dominante ; MPA : Acide Mycophénolique ; IgA : néphropathie à IgA ; mTORi : inhibiteurs de mTOR ; g : glomérulite ; cg : glomérulopathie d'allogreffe ; cpt : capillarite ; DSA : anticorps spécifiques du donneur ; neg : négatif , pos : positif

**Tableau 6. Caractéristiques cliniques des patients ST et cABMR**

<b>Caractéristiques des patients</b>	<b>ST</b>	<b>cABMR</b>	<b>P</b>
Nombre total (n)	27	17	
Age médian (moyenne (extrême)) (années)	53.44 (25-74)	54.65 (27-73)	ns
Femme, n (%)	8 (29.6)	3 (17.6)	ns
Créatinémie(μmol/L)	111.11 (77-180)	183.10 (101-271)	<0.001
Protéinurie (g/24h)	0,19 (0.03-0.50)	1.35 (0.12-6.55)	<0.001
<b>Maladie Autoimmune (n, %)</b>	4 (14.8)	1 (5.9)	ns
<b>Greffe antérieure</b>			
>1, n (%)	0 (D)	6 (35.3)	0.002
Délai depuis la transplantation (année)	3.3 (1-12)	8.1 (1.7-19.5)	0.001
<b>Immunisation pré-transplantation</b>			
PRA >10%, n (%)	0	8 (47.1)	<0.001
50 <PRA> 85, n (%)	0	4 (23.5)	
PRA >85%, n (%)	0	2 (11.8)	
<b>Traitement immunosuppresseur</b>			
Thérapie d'induction, n (%)	24 (88.9)	15 (88.2)	ns
Thymoglobulines	1 (3.7)	10 (58.8)	<0.001
Anti-IL-2R	23 (85.2)	5 (29.4)	<0.001
Tacrolimus ou Cyclosporine A	24 (88.8)	15 (88.2)	ns
Tacrolimus	12 (44.4)	11 (64.7)	ns
Cyclosporine	12 (44.4)	4 (23.5)	ns
MPA	24 (88.9)	17 (100)	ns
Stéroïdes	15 (55.6)	15 (88.2)	0.044
Belatacept	1 (3.7)	0	ns
mTORinhib	2 (7.4)	2 (11.8)	ns

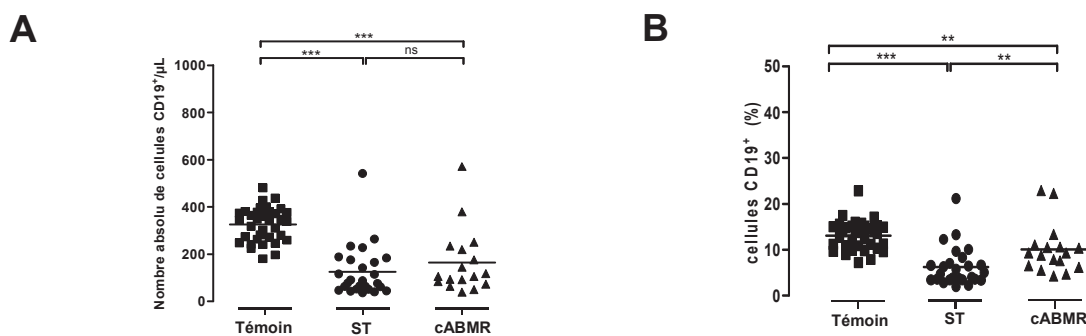
PRA : panel d'anticorps autoréactifs ; DSA : anticorps spécifiques du donneur ; Anti-IL-2R : anticorps anti-IL-2 récepteur ; MPA : Acide Mycophénolique ; mTOR : inhibiteurs de la rapamycine chez les mammifères ; *P* : test de Fisher ou test du Chi2 pour les valeurs qualitatives, test de Mann-Whitney pour les valeurs quantitatives.

### III. Résultats

#### 1. Le déséquilibre de distribution des sous-populations de LB et de LT des patients cABMR

##### 1.1. Les lymphocytes B

Nous avons dans un premier temps réalisé un phénotypage par cytométrie en flux des LB du sang périphérique de 17 patients ayant développé un rejet humoral chronique (cABMR), de 27 patients avec une fonction rénale stable (ST) ainsi que de 35 volontaires sains (Témoin). Nous observons une diminution significative du nombre absolu et du pourcentage de LB CD19<sup>+</sup> chez les patients greffés par rapport au groupe Témoin (figure 7A et 7B). Par ailleurs, le nombre de LB CD19<sup>+</sup> ne présente pas de différences significatives entre les groupes ST et cABMR, alors que le pourcentage de LB CD19<sup>+</sup> est plus élevé chez les patients cABMR.

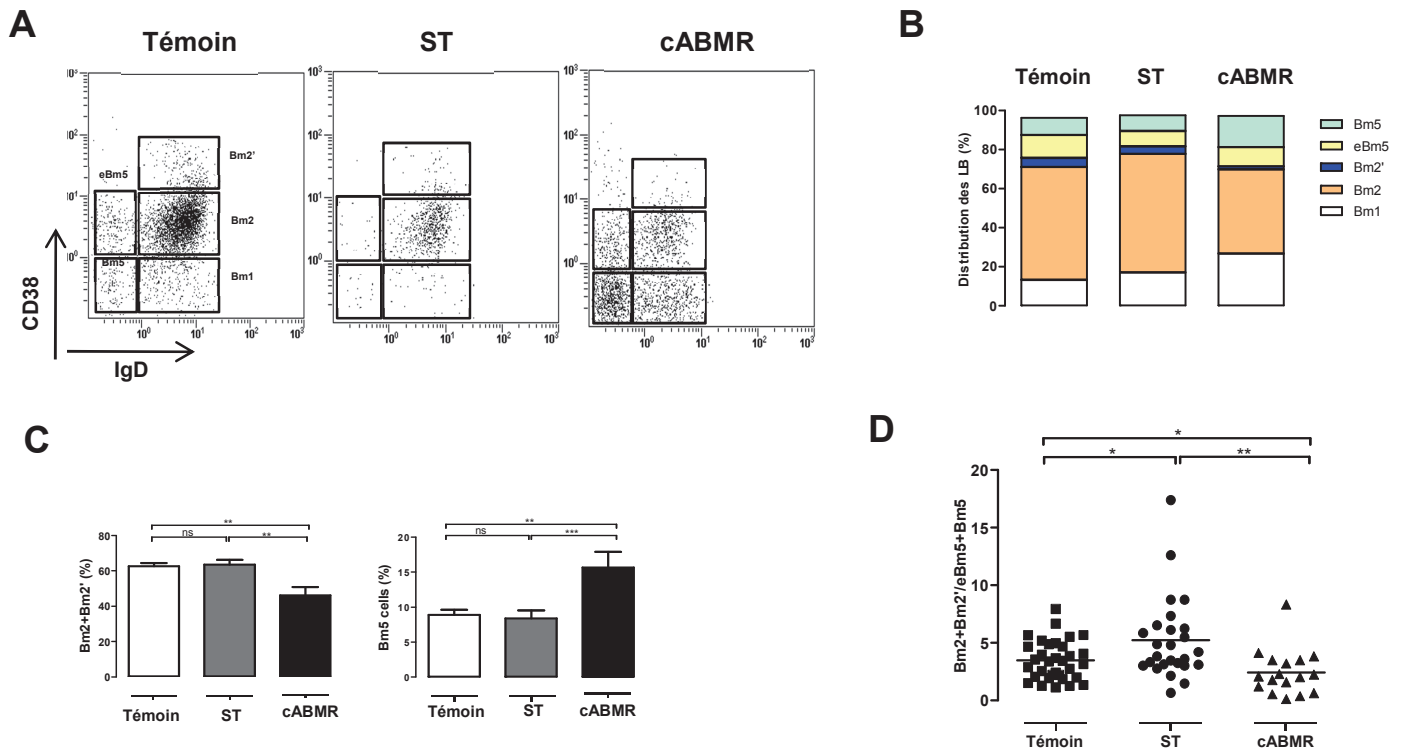


**Figure 7. Analyse de la population de LB CD19<sup>+</sup> du sang périphérique.**

Réalisée chez des patients cABMR, ST et des volontaires sains (Témoin) par cytométrie en flux. (A) : Nombre absolu de LB du sang périphérique en LB/µL dans les différents groupes. (B) : Fréquence des LB CD19<sup>+</sup> parmi les lymphocytes circulants. \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; ns = non significatif.

Nous nous sommes ensuite intéressés plus en détail aux différentes populations de LB. De ce fait, nous avons caractérisé les sous-populations de LB matures à l'aide du double marquage IgD/CD38 dans la population CD19<sup>+</sup>. Nous pouvons ainsi analyser les Bm1 (IgD<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>), les Bm2 (IgD<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>), les Bm2' (IgD<sup>+</sup> CD38<sup>fort</sup>), les eBm5 (IgD<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup>) et les Bm5 (IgD<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup>). Le groupe cABMR présente une diminution significative des LB activés (Bm2+Bm2') et une forte augmentation de la population B mémoire, les Bm5, par rapport aux patients stables (46,1±4,7% vs 63,6±2,7%, p=0,004 et 15,6±2,3% vs 8,4±1,1%, p=0,0008, respectivement) (figure 8A, 8B et 8C). Ces résultats sont également représentés par le ratio

« LB actifs / LB mémoires », qui est significativement plus faible chez les patients cABMR par comparaison à celui du groupe ST ( $2,1 \pm 0,4$  vs  $5,2 \pm 0,7$ ,  $p=0,002$ ) (figure 8D). Nous observons ainsi un déséquilibre des populations Bm2+Bm2' au profit des Bm5 dans le rejet humoral chronique.

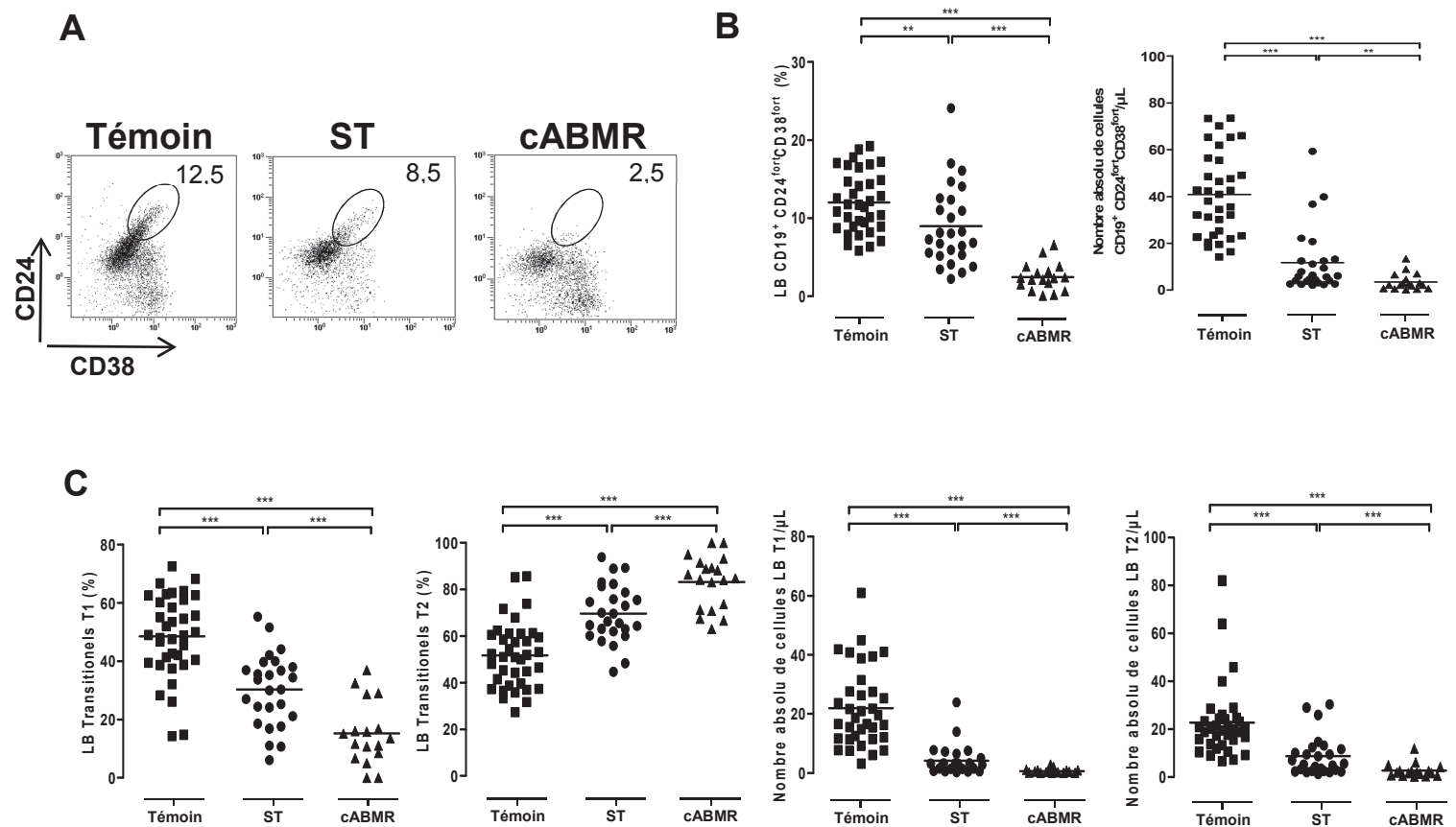


**Figure 8. Analyse des différentes sous-populations de LB matures du sang périphérique.**

Réalisée chez des patients cABMR, ST et des volontaires sains (Témoin). (A) : Dot plots représentatifs de l'expression de l'IgD et du CD38 sur la population  $CD19^+$ . (B) : Distribution en pourcentage des LB des cinq sous-populations de LB matures. (C) : Fréquence des Bm2+Bm2' et des Bm5 pour les trois groupes. (D) : Ratio Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5. \* $p<0.05$  ; \*\* $p<0.01$  ; \*\*\* $p<0.001$  ; ns = non significatif.

L'analyse des sous-populations de LB matures nous a ainsi permis de montrer une forte diminution de la population Bm2 + Bm2' chez les patients cABMR. Cette population  $IgD^+ CD38^{+fort}$  comprend une population reconnue pour ses propriétés régulatrices, les LB transitionnels  $CD19^+ CD24^{fort} CD38^{fort}$ . Les LB transitionnels présentent ici une diminution significative en fréquence et en nombre absolu dans le groupe cABMR par rapport au groupe stable ( $2,5 \pm 0,4\%$  vs  $8,9 \pm 1,0\%$ ,  $p<10^{-3}$  et  $3,5 \pm 0,8$  cellules/ $\mu L$  vs  $11,8 \pm 2,7$  cellules/ $\mu L$ ,  $p=0,001$ , respectivement) (figure 9A et 9B). Il est également décrit de manière générale que les LB transitionnels de type 1 peuvent être caractérisés par le marqueur CD5 (Sims et al.

2005). Ainsi, les LB transitionnels peuvent être séparés en deux populations, les LB T1  $CD24^{fort} CD38^{fort} CD5^{fort}$  (T1) et les LB T2  $CD24^{fort} CD38^{fort} CD5^{-/faible}$  (T2). L'analyse de ces sous-populations nous montre que le pourcentage de LB T1 est diminué chez les patients cABMR par comparaison avec les patients stables (figure 9C). Cependant, nous pouvons noter que le nombre absolu de ces deux populations de LB transitionnels est significativement plus faible chez les patients cABMR par rapport au groupe ST. Finalement, dans le groupe cABMR, nous avons une diminution des LB transitionnels, qui affecte principalement les LB T1  $CD5^{+}$ .

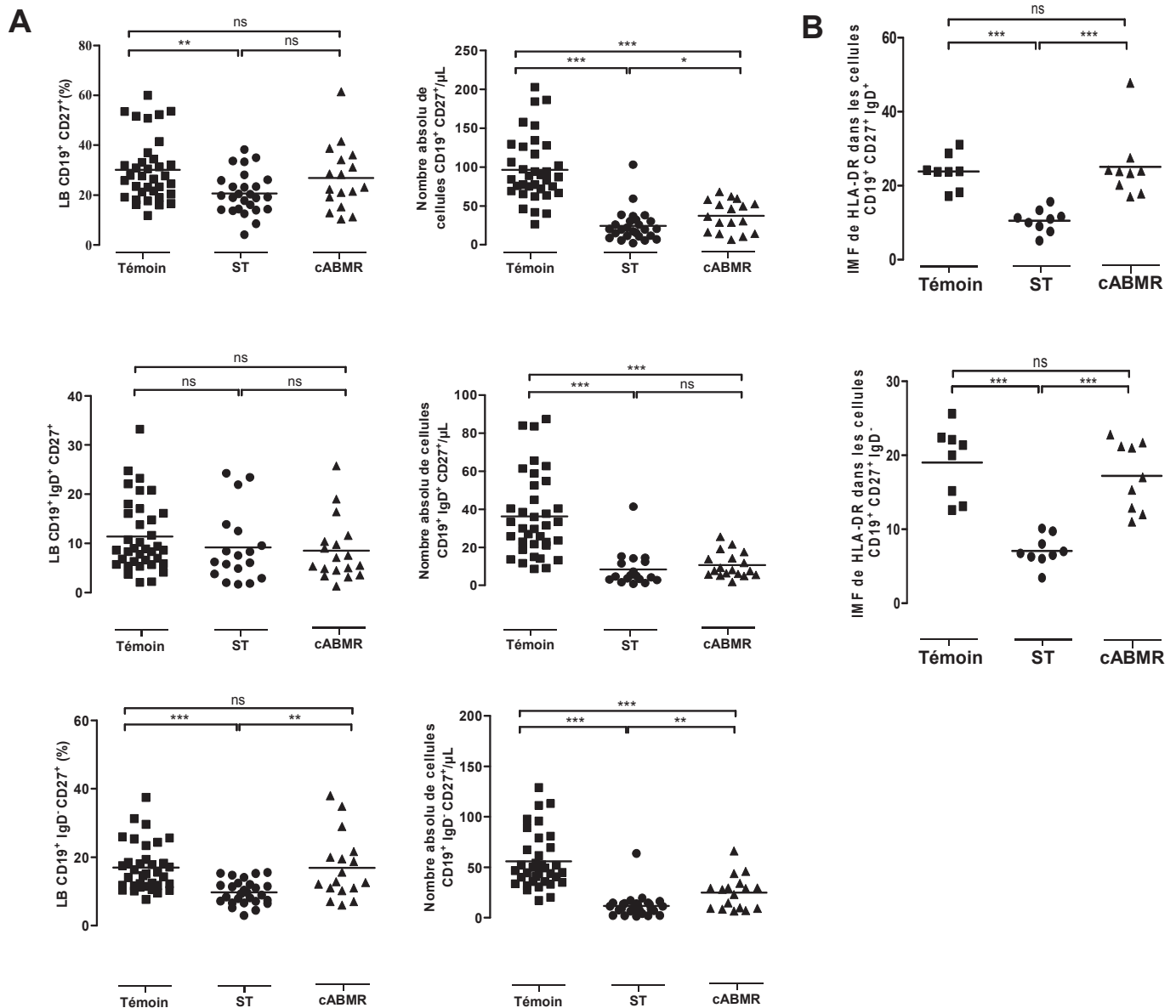


**Figure 9.** Analyse de la distribution des sous-populations de LB transitionnels dans le sang périphérique.

Réalisée chez des patients cABMR, ST et des volontaires sains (Témoin). (A) : Dot plots représentatifs de la population de LB transitionnels parmi les LB  $CD19^{+}$ . (B) : Fréquence et nombre absolu des LB transitionnels  $CD24^{fort} CD38^{fort}$  dans la population  $CD19^{+}$ . (C) : Fréquence et nombre absolu des LB  $CD24^{fort} CD38^{fort} CD5^{+}$  (T1) et  $CD24^{fort} CD38^{fort} CD5^{-}$  (T2) dans la population  $CD19^{+}$ . \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; ns = non significatif.

Au travers de l'analyse des sous-populations de LB matures, nous avons également montré que les patients cABMR présentent un fort taux de Bm5. Cette population IgD<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup> peut également être caractérisée par le marqueur CD27. C'est pourquoi nous avons dans un second temps analysé l'expression du marqueur CD27 sur les LB dans les trois groupes. Nous n'observons aucune différence significative sur la fréquence des LB CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> entre les groupes cABMR et ST (figure 10A). Les LB mémoires CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> peuvent être en outre divisés en deux sous-populations selon qu'ils aient ou non subi le switch de leur Ig de surface. Nous pouvons ainsi décrire les LB CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> appelés LB pré-switch et les LB CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> nommés LB post-switch. Les LB CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> ne présentent pas de différence significative, que ce soit en fréquence ou en nombre absolu entre les groupes ST et cABMR. Par contre, nous pouvons noter une augmentation de la population CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> en fréquence et en nombre absolu dans le groupe cABMR par rapport au groupe ST (16,9±2,3% vs 9,7±0,7%, p=0,006 et 25,0±4,1 cellules/μL vs 11,9±2,2 cellules/μL, p=0,002, respectivement) (figure 10A).

Par ailleurs, sachant que les LB mémoires sont connus pour exprimer fortement les molécules du CMH II (HLA-DR), leur conférant ainsi une forte capacité à présenter l'antigène, nous avons cherché à savoir si les patients cABMR surexpriment cette molécule. Par comparaison avec le groupe stable, nous avons ainsi observé que les LB CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> et CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> expriment davantage le HLA-DR chez les patients ayant développé un rejet humoral chronique (25,1±3,0 vs 10,5±1,0, p<10<sup>-3</sup> et 17,2±1,5 vs 7,0±0,7, p<10<sup>-3</sup>, respectivement) (figure 10B). Finalement, l'augmentation de la population de LB matures Bm5 observée chez les patients cABMR réside dans un excès plus particulièrement de cellules mémoires CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> à forte capacité de présentation antigénique.



**Figure 10.** Analyse de la distribution des sous-populations de LB mémoires dans le sang périphérique.

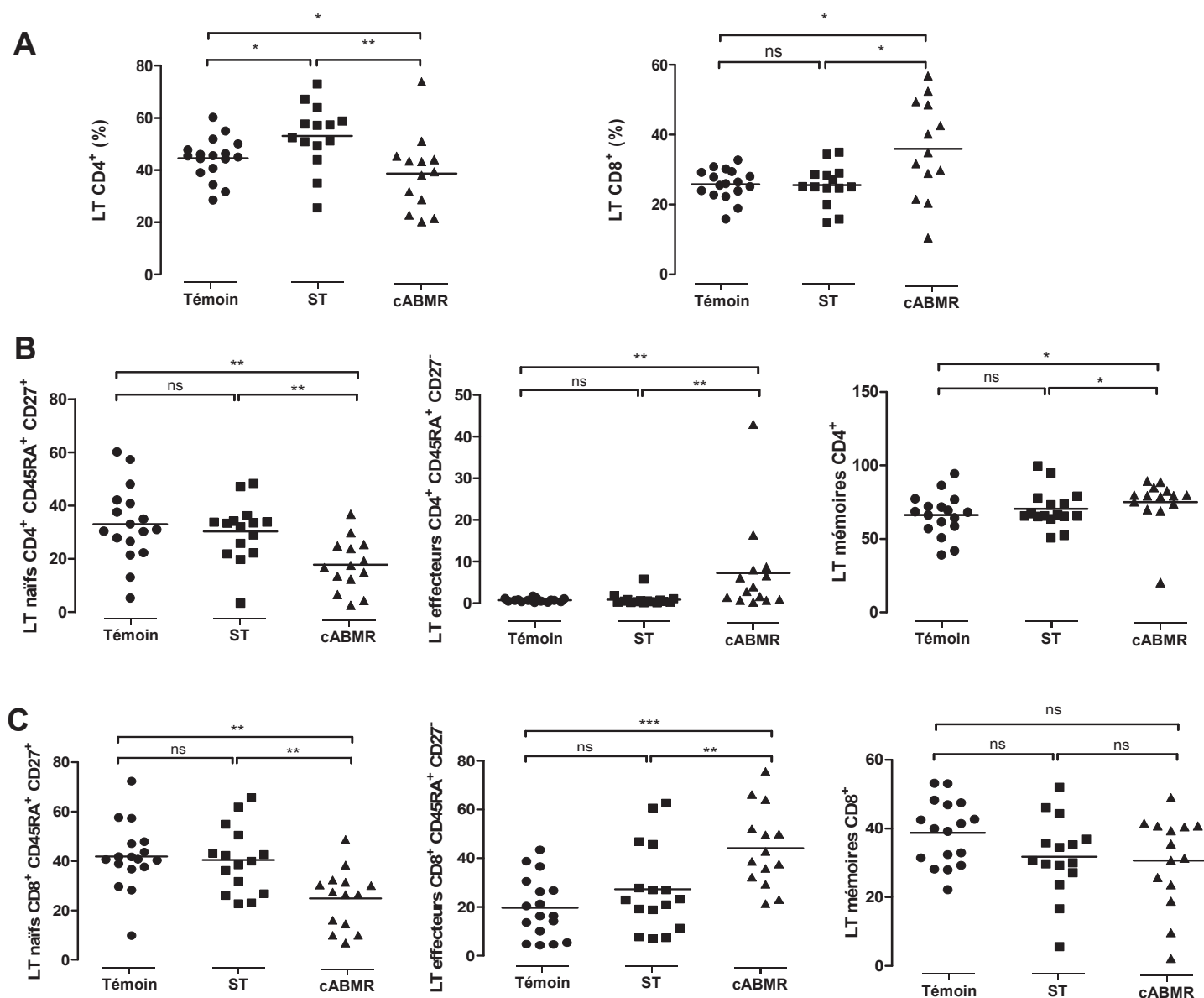
Réalisée chez des patients cABMR, ST et des volontaires sains (Témoins). (A). Fréquence et nombre absolu par  $\mu\text{L}$  de sang des populations  $\text{CD19}^+ \text{CD27}^+$ ,  $\text{CD19}^+ \text{IgD}^+ \text{CD27}^+$  et  $\text{CD19}^+ \text{IgD}^- \text{CD27}^+$ . (B). IMF de l'expression d'HLA-DR sur les populations  $\text{CD19}^+ \text{IgD}^+ \text{CD27}^+$  et  $\text{CD19}^+ \text{IgD}^- \text{CD27}^+$  par cytométrie en flux. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; ns = non significatif.

## 1.2. Les lymphocytes T

Enfin nous avons analysé le compartiment T dans les trois groupes afin de vérifier s'il existe également un défaut de distribution des LT. Pour cette étude nous avons phénotypé les LT à l'aide des marqueurs CD4, CD8, CD27 et CD45RA. Ainsi nous avons dans un premier temps observé le pourcentage de CD4 et de CD8. Pour chaque population, nous avons ensuite pu caractériser les LT naïfs  $CD45RA^+ CD27^+$ , les LT effecteurs  $CD45RA^+ CD27^-$  et les LT mémoires  $CD45RA^- CD27^{+/-}$ .

Globalement, les patients cABMR présentent un pourcentage plus important de LT  $CD8^+$  dans le sang tandis que les LT  $CD4^+$  sont quant à eux diminués par rapport aux patients stables ( $36,0 \pm 3,0\%$  vs  $25,6 \pm 1,6\%$ ,  $p=0,02$  et  $38,7 \pm 4,0\%$  vs  $53 \pm 3,3\%$ ,  $p=0,007$ , respectivement) (figure 11A). Par comparaison avec les patients stables, l'analyse plus approfondie de ces populations de LT nous permet d'observer que les LT naïfs  $CD4^+$  et  $CD8^+$  ( $CD45RA^+ CD27^+$ ) sont plus faiblement représentés chez les patients cABMR ( $17,75 \pm 2,6\%$  vs  $30,3 \pm 2,85\%$ ,  $p=0,004$  et  $24,9 \pm 3,2\%$  vs  $40,4 \pm 3,5\%$ ,  $p=0,008$ , respectivement) au détriment des LT effecteurs  $CD4^+$  et  $CD8^+$  ( $CD45RA^+ CD27^-$ ) ( $7,2 \pm 2,9\%$  vs  $0,9 \pm 0,3\%$ ,  $p=0,001$  et  $44,2 \pm 4,4\%$  vs  $27,3 \pm 4,4\%$ ,  $p=0,007$ , respectivement) (figure 11B et 11C). L'étude des populations de LT mémoires  $CD4^+$  et  $CD8^+$  ( $CD45RA^- CD27^{+/-}$ ) quant à elle ne montre pas de réelle différence entre les trois groupes, même si le pourcentage de LT  $CD4^+$  mémoires est légèrement augmenté chez les patients cABMR par rapport au groupe stable ( $75,0 \pm 4,5\%$  vs  $70,4 \pm 3,2\%$ ,  $p=0,02$ ) (figure 11B et 11C). Finalement, il est important de noter que les LT sont pour la plupart des LT activés chez les patients cABMR, et sont  $CD8^+$  pour une grande majorité.





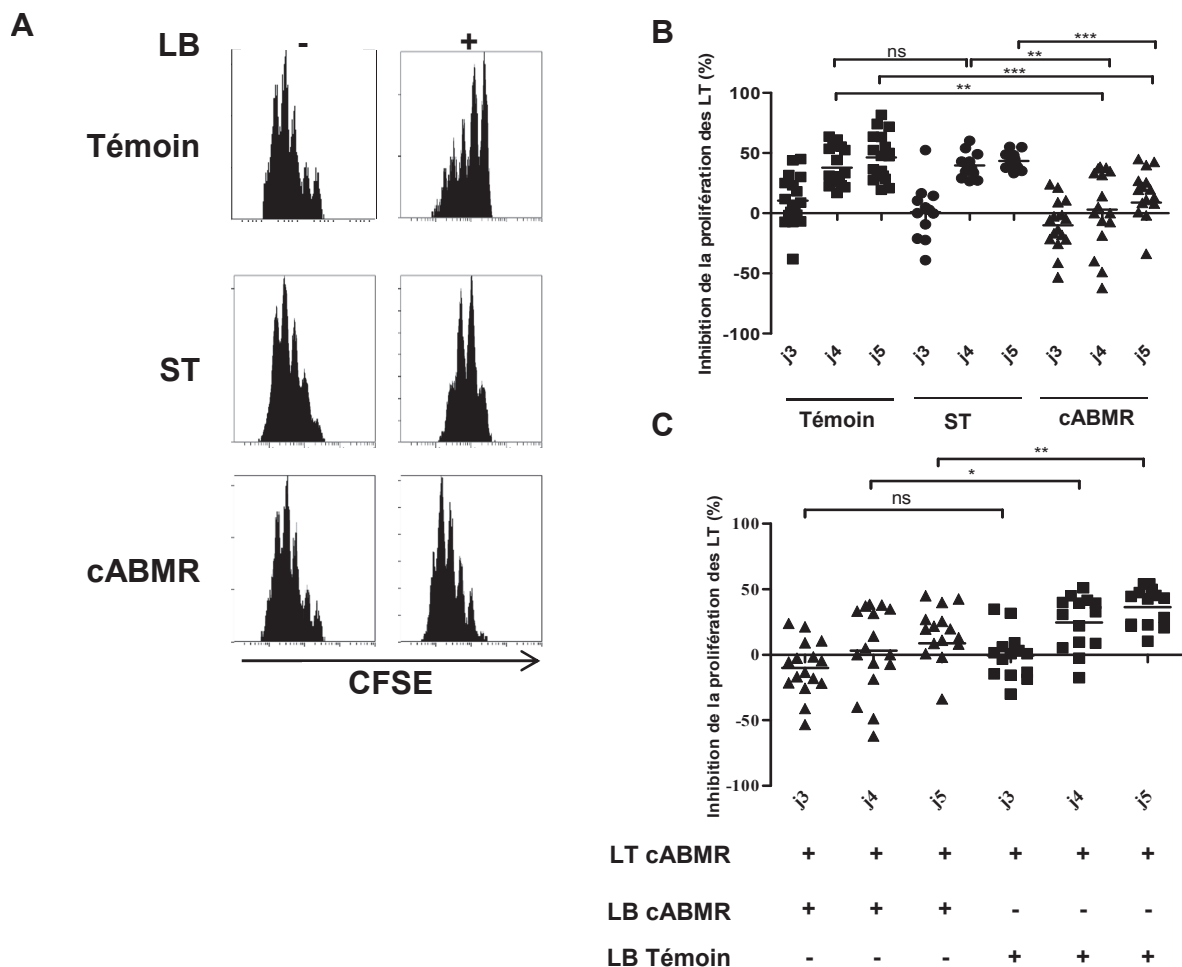
**Figure 11. Analyse de la distribution des LT dans le sang périphérique.**

Réalisée chez des patients cABMR, ST et des volontaires sains (Témoin). (A) : Pourcentage de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. (B) : Pourcentage de LT CD4<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>), effecteurs (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) et mémoires (CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+/-</sup>). (C) : Pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>), effecteurs (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) et mémoires (CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+/-</sup>). \*p<0,05 ; \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; ns = non significatif.

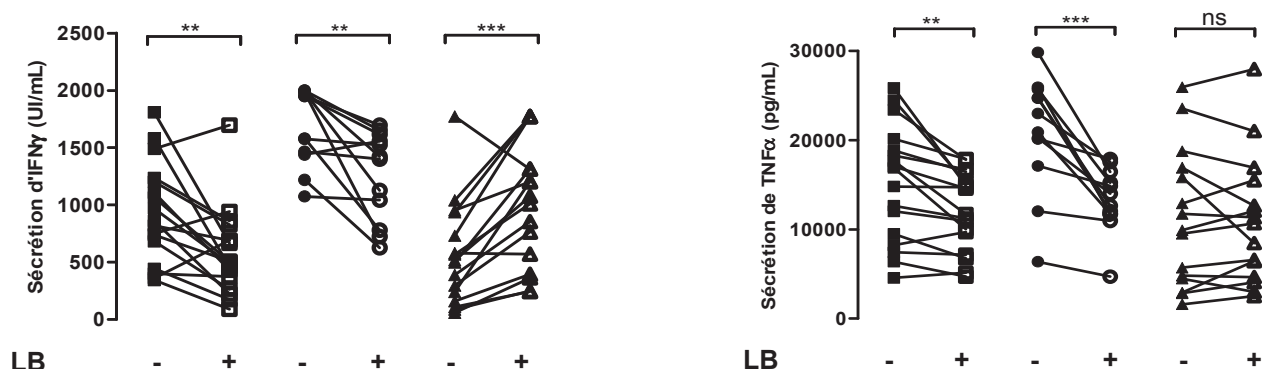
## **2. Le défaut de régulation des LB des patients cABMR**

Nous avons ainsi observé un défaut de distribution des populations de LB chez les patients cABMR. La question suivante a été de savoir si cette anomalie phénotypique a des répercussions sur la fonction régulatrice des LB. Ainsi, dans le but de mettre en évidence la capacité de régulation des LB sur les LT, nous avons réalisé des cocultures autologues LT/LB dans les trois groupes (Témoin=18 ; ST=12 ; cABMR=16) ainsi que des cultures hétérologues entre LT de patients cABMR et LB de témoins (Témoin=18 ; ST=11 ; cABMR=14). Les LB des patients cABMR sont incapables d'inhiber la prolifération des LT par comparaison avec les groupes Témoin et ST ( $3,7 \pm 8,1\%$  d'inhibition vs  $37,8 \pm 3,8\%$ ,  $p=0,006$  et  $3,7 \pm 8,1\%$  vs  $39,5 \pm 2,5\%$ ,  $p=0,004$ , respectivement) (figure 12A et 12B). Les LT des patients cABMR sont pourtant aptes à proliférer comme le démontre la figure 12A. Cependant, nous avons aussi montré qu'il existe un défaut de distribution des LT chez les patients cABMR, laissant penser qu'il puisse exister une anomalie fonctionnelle du LT. Ainsi, afin de déterminer si le défaut de suppression observé est lié aux LT ou aux LB, nous avons par ailleurs réalisé des cocultures hétérologues entre LB de témoins et LT de patients cABMR. Les LT de patients cABMR sont sensibles à l'inhibition de la prolifération en présence de LB de volontaires sains (figure 12C). Ces résultats suggèrent que les LT des patients cABMR ne sont pas réfractaires à la suppression, et donc que le défaut d'inhibition de prolifération des LT en coculture autologue est dû au LB.

Nous avons également analysé la sécrétion par les LT de cytokines assimilées à la réponse Th1, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  dans les surnageants de cocultures autologues. En effet, d'après des résultats publiés au laboratoire, le LB sain inhibe la différenciation en Th1 (Lemoine et al. 2011). Le dosage par ELISA de ces deux cytokines montre ici une absence d'inhibition de la sécrétion d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  dans le groupe cABMR par rapport aux groupes Témoin et ST ( $p=0,003$  et  $p=0,004$  respectivement pour l'IFN $\gamma$  et  $p=0,002$  et  $p=0,0003$  respectivement pour le TNF $\alpha$ ) (figure 13). Par ailleurs, la production d'IFN $\gamma$  en coculture est significativement plus importante chez les patients cABMR par comparaison aux groupes contrôles.



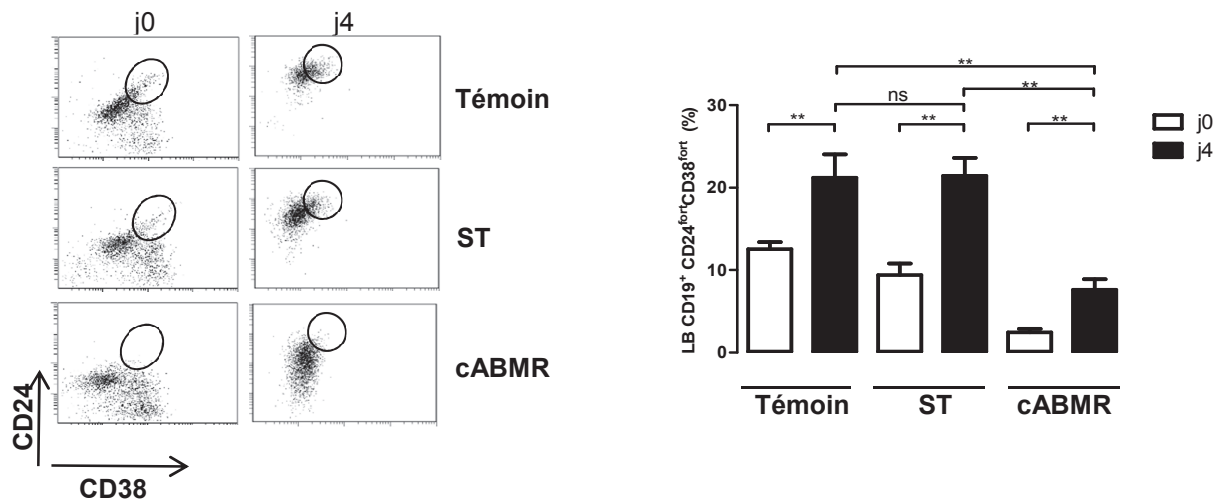
**Figure 12. Le LB dans le rejet humoral chronique n'a pas de propriétés régulatrices.** Les LT de patients cABMR, ST et volontaires sains (Témoin) marqués au CFSE sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 5 jours, en présence ou non de LB stimulés par CpG ODN. (A) : Analyse représentative par cytométrie en flux du marquage CFSE à J4, en absence ou présence de LB. (B) : Expression en pourcentage de l'inhibition de la prolifération des LT par les LB de J3 à J5 en coculture autologue. (C) : Pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT de patients cABMR en présence de LB de volontaires par comparaison aux cocultures autologues LT/LB cABMR. \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; ns = non significatif.



**Figure 13. Analyse de la sécrétion d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  en coculture.**

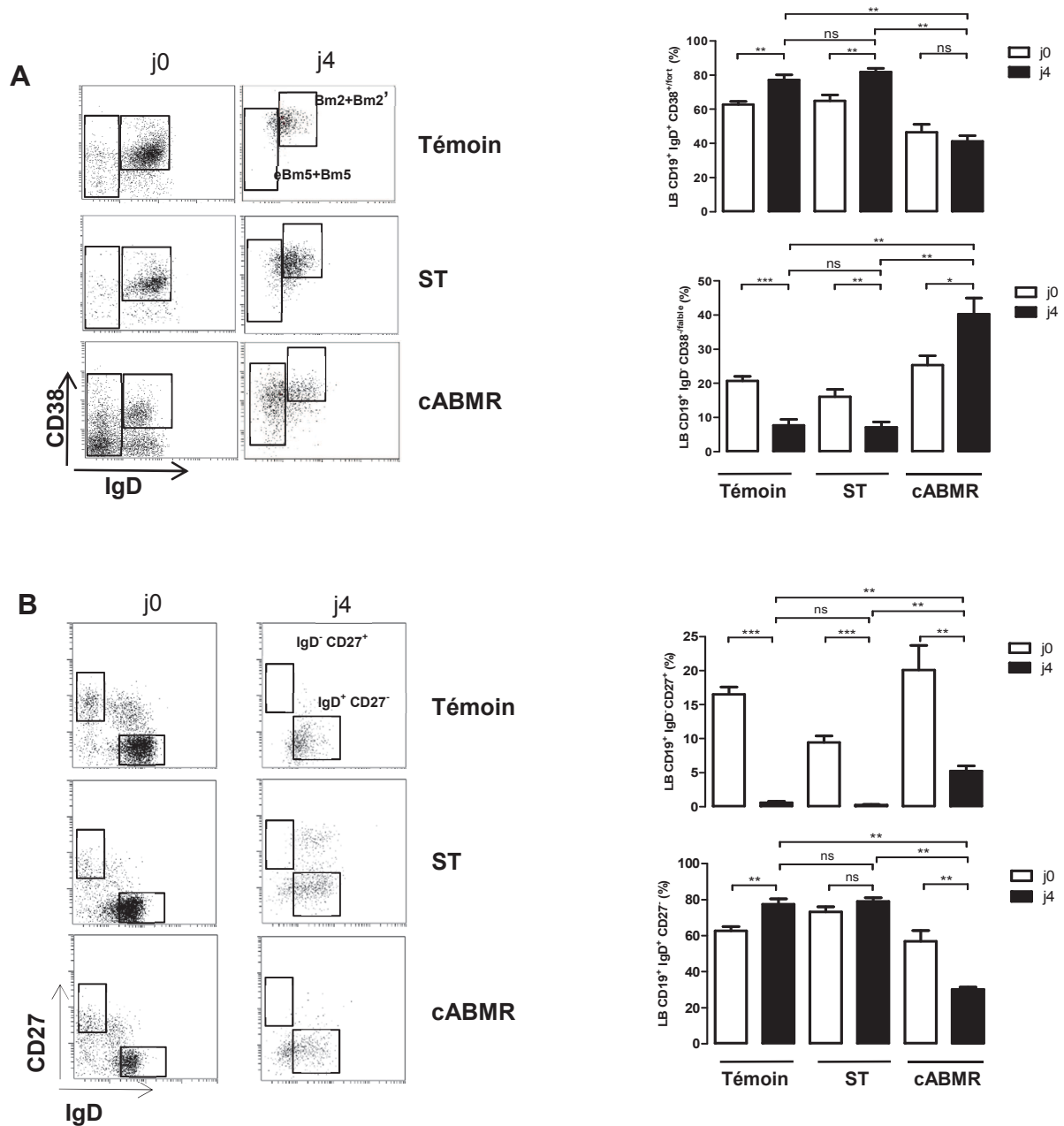
Déterminée par ELISA à J4 dans le surnageant de culture de patients cABMR, ST et de volontaires sains (Témoin), de LT seuls ou en présence de LB. \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; ns = non significatif.

Dans un second temps nous avons cherché à déterminer le profil des LB suite à leur activation au contact des LT. Afin de répondre à cette question, nous avons phénotypé les LB par cytométrie en flux au jour 4 de coculture. Par comparaison avec les populations de LB du sang périphérique au jour 0, nous observons deux fois plus de LB CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup> en culture dans les groupes Témoin (p=0,008), ST (p=0,003) et cABMR (p=0,001). Cependant, le pourcentage de LB transitionnels reste significativement plus faible chez les patients cABMR par comparaison à celui des témoins (p= 0,003) et des patients stables (p=0,001) (figure 14A). Par ailleurs, la majorité des LB des témoins et des patients ST acquiert un phénotype IgD<sup>+</sup> CD38<sup>+/fort</sup> (Bm2+Bm2') entre le jour 0 et le jour 4 tandis que le pourcentage de ces cellules ne varie pas chez les patients cABMR après activation (figure 15A). Ces résultats concordent avec la forte diminution des LB IgD<sup>-</sup> CD38<sup>faible</sup> dans les groupes Témoin (p<10<sup>-3</sup>) et ST (p<10<sup>-3</sup>) ainsi qu'à l'augmentation de cette population dans le groupe cABMR de J0 à J4 (p=0,01). Ces observations se reflètent également dans l'analyse des LB IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>. Cette population est en effet significativement diminuée après activation des LB au jour 4 dans les 3 groupes, mais il persiste toujours un pourcentage significativement plus élevé dans le groupe cABMR par rapport à celui des groupes Témoin et ST (5,25±0,7% vs 0,6±0,2%, p=0,006 et 5,25±0,7% vs 0,26±0,7%, p=0,009, respectivement) (figure 15B). La population IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> quant à elle est fortement représentée dans les groupes Témoin et ST par comparaison avec le groupe cABMR (77,5±2,9% vs 30,1±1,4%, p=0,006 et 78,9±2,1% vs 30,1±1,4%, p=0,009, respectivement) (figure 15B). Et tandis qu'elle se maintient entre le jour 0 et le jour 4 chez le patient ST, elle est divisée par deux en culture chez les patients cABMR (p=0,006). Le déséquilibre de distribution des LB observé chez les patients cABMR persiste donc après activation des LB en coculture.



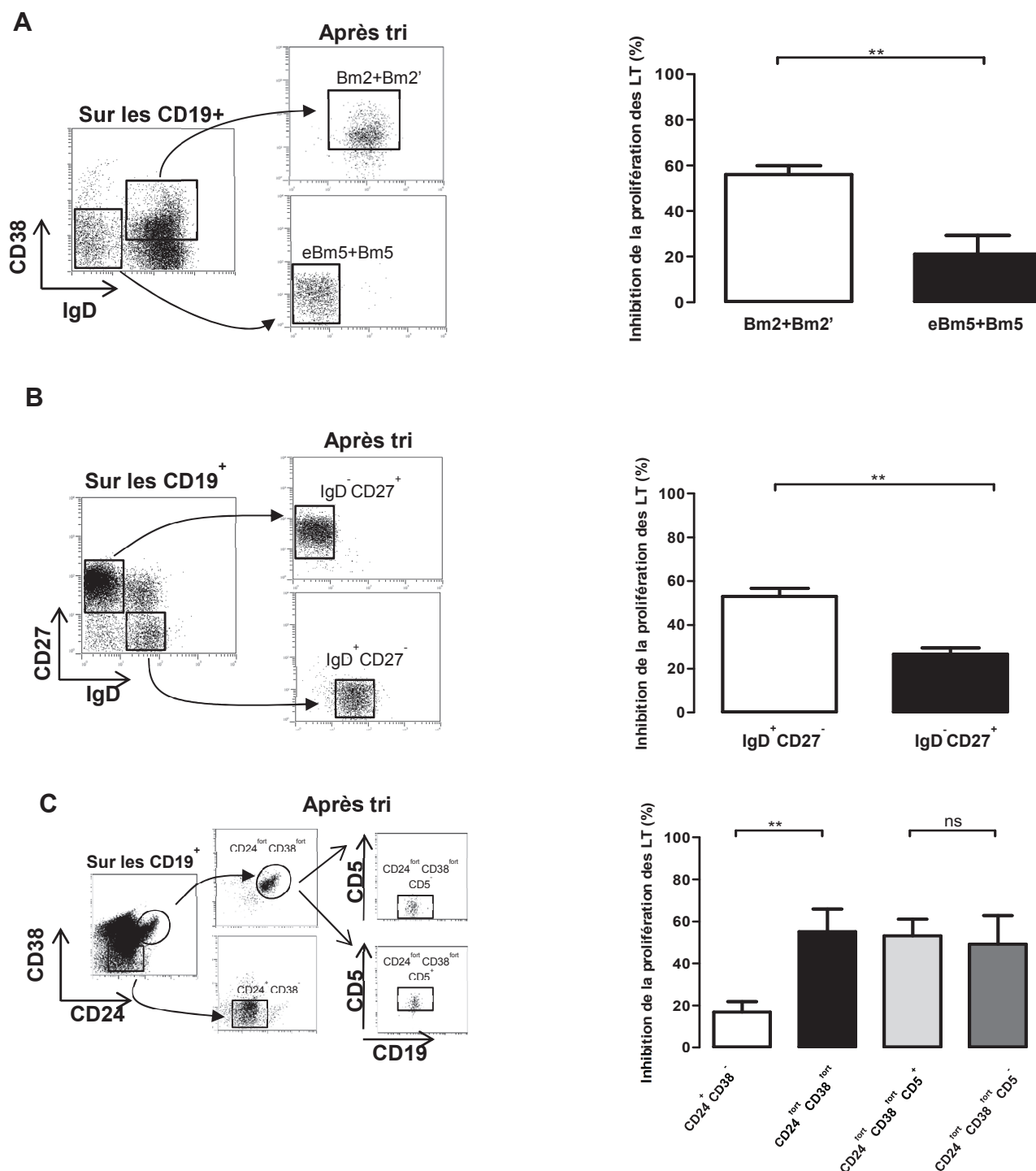
**Figure 14. Analyse du phénotype des LB transitionnels en coculture.**

Les lymphocytes B de volontaires sains (Témoin), de patients greffés stables (ST) et de patients ayant développé un rejet humoral chronique (cABMR) ont été marqués par anti-CD19/anti-CD24/anti-CD38 à J0 et à J4 de coculture. Les LT sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 et les LB par du CpG. Les graphiques de cytométrie représentatifs d'une expérience sont représentés à gauche tandis que la fréquence des populations cellulaires des différents groupes est montrée à droite. \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; ns= non significatif.



**Figure 15.** Analyse du phénotype des populations de LB IgD<sup>+</sup> CD38<sup>fort</sup>, IgD<sup>-</sup> CD38<sup>faible</sup>, IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> et IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> en coculture.

Les lymphocytes B de volontaires sains (Témoin), de patients greffés stables (ST) et de patients ayant développé un rejet humoral chronique (cABMR) ont été marqués par (A) anti-CD19/anti-CD38/anti-IgD, (B) anti-CD19/anti-CD27/anti-IgD à J0 et à J4 de coculture. Les LT sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 et les LB par du CpG. Les graphiques de cytométrie représentatifs d'une expérience sont représentés à gauche tandis que la fréquence des populations cellulaires des différents groupes est montrée à droite. \*p<0.05 ; \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; ns= non significatif



**Figure 16. Les sous-populations de LB purifiées présentent des capacités suppressives différentes.**

Les LB ont été triés chez des volontaires sains (Témoin) par cytométrie en flux, puis ont été ajoutés en culture pendant 4 jours avec des LT purifiés, marqués au CFSE et stimulés par anti-CD3 et anti-CD28, en présence de CpG. (A) : Les populations de LB Bm2+Bm2' et de LB eBm5+Bm5 de volontaires sains ont été triées par cytométrie en flux selon l'expression de l'IgD et du CD38 (à gauche). Le pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT est représenté à droite. (B) : Pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT en culture avec des LB IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> et IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>. (C) : Inhibition de la prolifération des LT en présence de LB CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup>, de LB CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup> CD5<sup>-</sup> et de LB CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup> CD5<sup>+</sup>. \*\*p<0.01; ns = non significatif.

Compte tenu des résultats précédents, le groupe cABMR présente un déséquilibre de distribution des LB associé à un défaut de régulation des LT par les LB. De plus, ce déséquilibre persiste après activation des LB chez ces patients. Il semble donc intéressant de chercher à savoir si les populations déficitaires chez les patients cABMR ont le même potentiel régulateur que celles qui sont en excès. C'est pourquoi, nous avons ainsi trié chez des volontaires sains, les populations  $CD19^+ IgD^+ CD38^{+/fort}$ , correspondant aux Bm2+Bm2' d'une part et les  $CD19^+ IgD^- CD38^{+/faible}$  représentant les eBm5+Bm5 d'autre part (figure 16A). Nous observons une inhibition de la prolifération des LT significativement plus importante par les Bm2+Bm2' par rapport à celle générée par les eBm5+Bm5 ( $56,3 \pm 4,3\%$  d'inhibition vs  $21,1 \pm 9,2\%$ ,  $p=0,005$ ) (figure 16A). Nous constatons de la même manière que les LB  $IgD^+ CD27^-$  et transitionnels  $CD24^{fort} CD38^{fort}$  inhibent plus fortement la prolifération des LT par comparaison aux LB  $IgD^- CD27^+$  et  $CD24^+ CD38^-$  respectivement ( $53 \pm 3,75\%$  d'inhibition vs  $26,7 \pm 2,8\%$ ,  $p=0,002$  et  $55,2 \pm 10,7\%$  vs  $17,0 \pm 4,9\%$ ,  $p=0,008$ , respectivement) (figure 16B et 16C). Nous avons ensuite choisi de séparer les LB transitionnels en  $CD5^+$  (LB T1) et  $CD5^-$  (LB T2), afin de vérifier s'il existe une différence dans la capacité de régulation du LB en fonction de la molécule CD5. Nous avons ainsi constaté que les LB transitionnels  $CD5^+$  et  $CD5^-$  possèdent des capacités suppressives identiques sur les LT (figure 16C).

#### IV. CONCLUSION

Pour la première fois chez l'Homme, l'analyse phénotypique des LB du sang périphérique de patients cABMR montre qu'il existe un déséquilibre de distribution des LB chez ces patients par rapport aux patients avec une fonction rénale stable. Ce déséquilibre persiste également après activation des LB de ces patients en coculture avec des LT. Par ailleurs, les LB de patients cABMR sont fonctionnellement différents de ceux de patients stables. En coculture, ils n'inhibent ni la prolifération des LT, ni leur différenciation en Th1. En outre, nous avons aussi montré que les populations faiblement représentées dans le groupe cABMR sont celles qui ont un fort potentiel régulateur.



**IMPLICATION DE LA VOIE  
TGFB/IDO DANS LES  
MECANISMES DE REGULATION  
DU LYMPHOCYTE B**

## **I. Introduction**

Suite à la mise en évidence d'une régulation des LT par les LB dans notre première étude, nous avons ensuite cherché à comprendre quels sont les mécanismes mis en jeu lors de cette régulation. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur deux cytokines : l'IL-10 et le TGF $\beta$ . Si la sécrétion d'IL-10 est une caractéristique majeure des Bregs, le TGF $\beta$  semble quant à lui être une cytokine essentielle dans notre modèle. Par ailleurs, nous avons également mis en évidence la présence de populations de Tregs au sein de nos cocultures, ce qui suggère que les LB sont capables de promouvoir l'induction de Tregs.

Ces premières observations nous ont conduit par la suite à rechercher en amont le moyen par lequel ces Tregs sont induits, et nous avons axé notre étude principalement sur une enzyme, l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO). Cette enzyme est exprimée par les DC suite notamment à une stimulation par le TGF $\beta$ . Bien connue dans le monde de l'immunologie pour ses propriétés immunosuppressives sur les LT, en particulier par la génération de Tregs, cela en fait d'elle une cible intéressante dans notre étude (Mezrich et al. 2010).

Compte tenu des données précédemment établies lors de nos premiers travaux, nous avons en parallèle réalisé ces expériences chez des patients cABMR afin d'essayer d'expliquer l'absence de fonction régulatrice des LB chez ces patients.

## **II. MATERIEL ET METHODES**

### **1. Groupe d'étude**

Nous avons étudié deux groupes de patients transplantés rénaux. Tous les patients et les volontaires sains inclus dans l'étude ont donné leur consentement éclairé et font partie d'un cadre éthique défini par l'établissement hospitalo-universitaire de Brest. Les critères d'inclusion établis pour les groupes de patients stables (ST) et de patients qui développent un rejet humoral chronique (cABMR) sont les mêmes que ceux de la première étude.

### **2. Culture cellulaire**

Les cultures cellulaires ainsi que l'étude de la prolifération des LT ont été réalisées selon les mêmes conditions que lors du premier article. Par ailleurs, les expériences utilisant des anticorps bloquants font intervenir un anti-TGF $\beta$  bloquant (Abcam) à 5 $\mu$ g/mL, un anti-IL-

10 bloquant (BD Biosciences) à 5µg/mL ou le traitement par un inhibiteur de l'enzyme IDO, le 1-Methyl-DL-Tryptophan (1MT) (Sigma-Aldrich) à 600µM.

### **3. Dosage des cytokines**

Les surnageants de culture ont été collectés et les particules résiduelles ont été éliminées par centrifugation. Des kits commerciaux ont permis de mesurer l'IFN $\gamma$  (Beckman Coulter) et l'IL-10 (BD Biosciences). Les différents ELISA ont été réalisés selon les instructions fournies.

### **4. Cytométrie en flux**

Lors des cocultures, les marquages de l'IL-10, du TGF $\beta$  et d'IDO sont réalisés suite à une étape préalable de fixation et de perméabilisation à l'aide du kit Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup> Fixation/Perméabilization Kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Les anticorps utilisés sont un anti-IL-10 couplé FITC (R&D System), un anti-TGF $\beta$  couplé PE (R&D System) et un anticorps polyclonal anti-IDO (Thermo Fisher Scientific). L'anticorps secondaire utilisé pour détecter IDO est un anticorps d'âne anti-mouton couplé FITC (Jackson ImmunoResearch). Les LT positifs à Foxp3 sont identifiés à l'aide d'un anti-Foxp3 couplé PE (BD Biosciences) selon les conditions spécifiques indiquées dans le kit approprié. Les marqueurs isotypiques de ces anticorps ont servi de contrôles négatifs afin d'établir le seuil de détection.

### **5. Analyses statistiques**

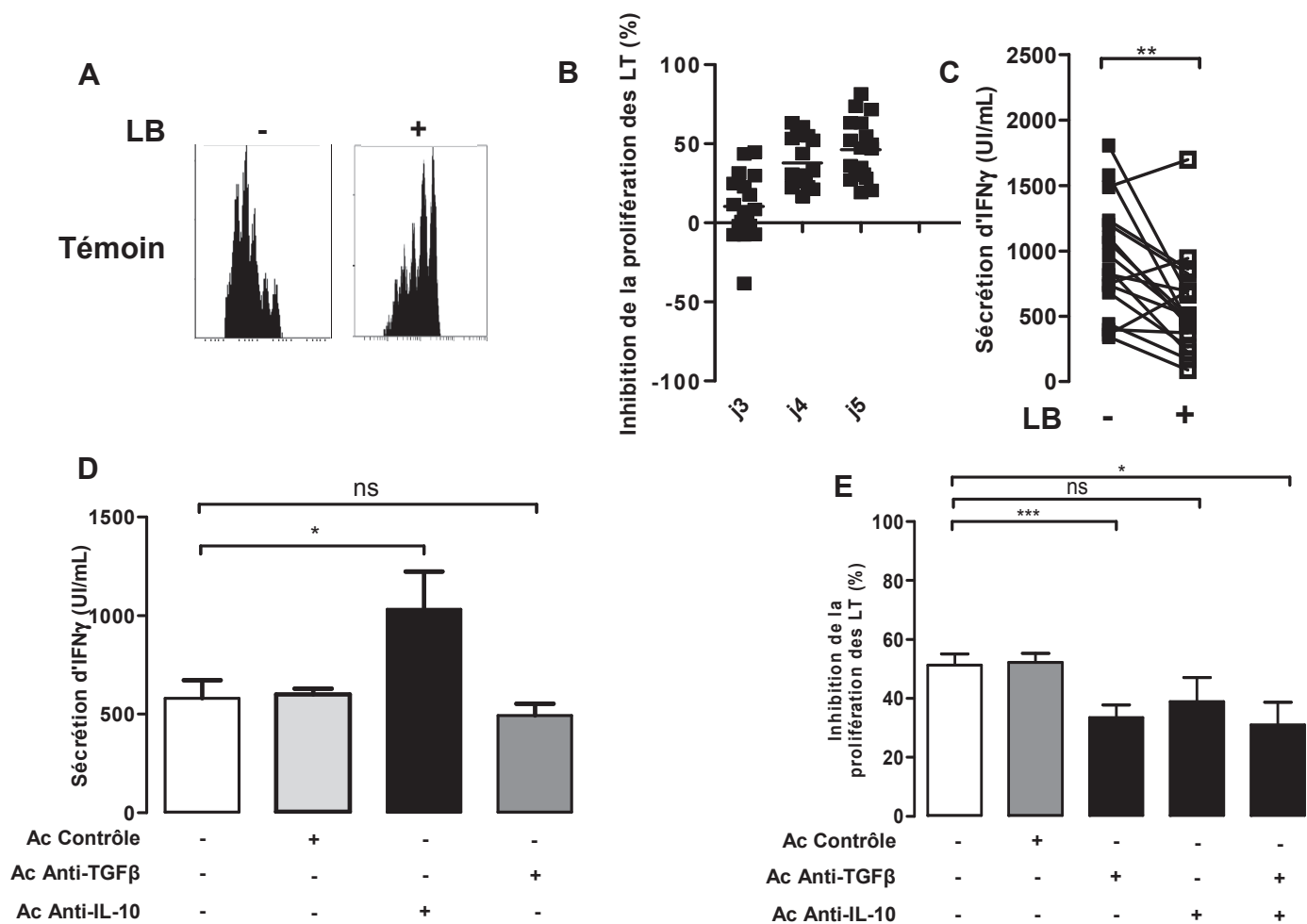
Les données statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5, en utilisant soit le test non paramétrique Mann-Whitney, soit le t-test apparié, et exprimées par l'erreur standard de la moyenne. Lorsque  $p < 0,05$ , la différence est considérée comme significative.

### III. Résultats

#### 1. Le rôle de l'IL-10 et du TGFβ en coculture

A partir des résultats établis lors de la première partie, nous avons poursuivi notre étude dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la prolifération des LT. En effet, nous avons montré chez des volontaires sains, la capacité des LB à inhiber la prolifération des LT de J3 à J5 en coculture (figure 17A et 17B). L'analyse des surnageants de cocultures par ELISA nous avait ensuite permis de démontrer que cette capacité de suppression du LB est couplée à une diminution de la sécrétion d'IFNγ par les LT (figure 17C). Dans notre modèle, le LB est ainsi impliqué dans deux phénomènes, l'inhibition de la prolifération des LT et l'inhibition de la différenciation des LT en Th1.

En s'appuyant sur la littérature, nous pouvons rapidement faire le lien entre Bregs sécréteurs d'IL-10 et inhibition de la différenciation des LT en Th1. En effet, l'IL-10 est connue pour agir directement sur la sécrétion d'IFNγ (Blair et al. 2010). Cependant, les Bregs sécrètent également du TGFβ, ce qui fait d'elle une cytokine à étudier au même titre que l'IL-10. Dans le but de vérifier l'implication de ces deux cytokines sur la différenciation Th1 dans notre modèle, nous avons réalisé des cocultures LT/LB dans lesquelles nous avons ajouté un anticorps bloquant l'IL-10 ou le TGFβ. Nous avons ensuite mesuré la sécrétion d'IFNγ par ELISA au jour 4. Le blocage de l'IL-10 restaure de manière significative la sécrétion en IFNγ dans les cocultures ( $581 \pm 91,6 \text{ UI}$  vs  $1033 \pm 190,7 \text{ UI}$ ,  $p=0,04$ ) (figure 17D). Par contre, le fait de neutraliser le TGFβ n'a aucun effet sur la sécrétion d'IFNγ ( $580,9 \pm 91,6 \text{ UI}$  vs  $493,5 \pm 60,1 \text{ UI}$ ,  $p=0,75$ ) (figure 17D). Ainsi, d'après ces premiers résultats nous pouvons suggérer que l'IL-10 peut être partiellement responsable de l'inhibition de la différenciation Th1 dans notre modèle. Suite à cela, nous avons cherché à savoir si ces deux cytokines sont également impliquées dans le processus de régulation de la prolifération des LT en coculture. Suivant le même schéma que précédemment, nous avons étudié la prolifération des LT marqués préalablement au CFSE, en présence des anticorps bloquant l'IL-10 et/ou le TGFβ. Il est intéressant de constater que la neutralisation de l'IL-10 n'a aucun impact sur la prolifération des LT tandis qu'ici, le blocage du TGFβ rétablit partiellement la prolifération ( $p=0,14$  et  $p<10^{-3}$  respectivement) (figure 17E). Finalement, ces deux cytokines semblent jouer un rôle bien distinct et complémentaire dans notre modèle, l'IL-10 agit sur la différenciation Th1 et le TGFβ sur le contrôle de la prolifération des LT.



**Figure 17. L'IL10 et le TGF $\beta$  jouent deux rôles distincts en coculture.**

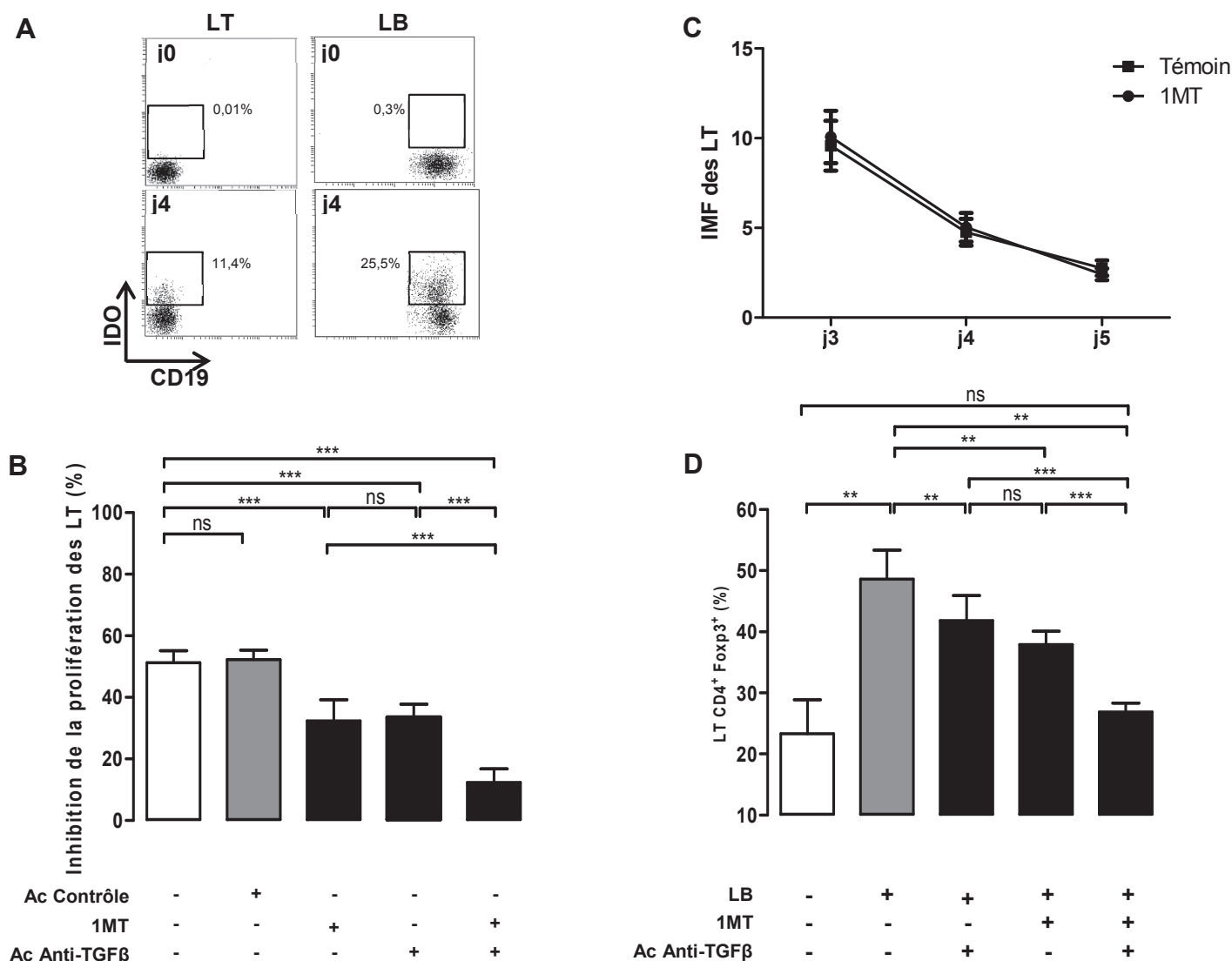
Les LT de volontaires sains (Témoin) marqués aux CFSE sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28, en présence ou non de LB stimulés par CpG. **(A)** : Analyse représentative par cytométrie en flux du marquage CFSE à J4, en absence ou présence de LB. **(B)** : Expression en pourcentage de l'inhibition de la prolifération des LT par les LB de J3 à J5 en coculture autologue. **(C)** : Sécrétion d'IFN $\gamma$  déterminée par ELISA dans le surnageant de culture de volontaires sains à J4 de LT seuls ou en présence de LB. **(D)** : Sécrétion d'IFN $\gamma$  déterminée par ELISA dans le surnageant de coculture de volontaires sains à J4, en présence ou non de 5 $\mu$ g/mL d'anti-TGF $\beta$  bloquant ou d'anti-IL-10 bloquant. Cinq  $\mu$ g/mL d'isotype contrôle sont utilisés en contrôle. **(E)** : Inhibition de la prolifération des LT en coculture en présence de 5 $\mu$ g/mL d'anti-TGF $\beta$  bloquant, d'anti-IL-10 bloquant ou les deux. Cinq  $\mu$ g/mL d'isotype contrôle sont utilisés en contrôle. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; ns = non significatif.

## 2. Les fonctions régulatrices du LB font intervenir un axe régulateur TGF $\beta$ /IDO

Suite à ces résultats et afin d'affiner les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de la prolifération des LT, nous nous sommes intéressés à une enzyme immunosuppressive,

l'indoleamine 2,3 dioxygénase. En effet, il est décrit dans les cellules dendritiques que cette enzyme est sécrétée après une stimulation par du TGF $\beta$ , résultant en l'inhibition de la prolifération des LT via l'induction de Tregs (Pallotta et al. 2011). Ainsi, le rôle du TGF $\beta$  sur la prolifération des LT dans notre modèle nous a amené à suspecter l'implication d'IDO.

La première étape a donc été de vérifier l'expression de cette enzyme par les LB, et également par les LT. Elle n'est pas exprimée dans des LT et des LB naïfs mais elle est induite à J4 après stimulation, que ce soit dans les LT ou les LB (0,01% au jour 0 vs 11,4% au jour 4 pour les LT et 0,3% au jour 0 et 25,5% au jour 4 pour les LB) (figure 18A). Afin de vérifier l'hypothèse de l'implication d'IDO dans les mécanismes régulateurs de la prolifération des LT, nous avons ensuite réalisé des cocultures en présence d'un inhibiteur spécifique de cette enzyme, le 1-méthyl-tryptophane (1-MT). De manière significative, le 1-MT restaure partiellement la prolifération des LT, à l'instar du TGF $\beta$  bloquant ( $51,3 \pm 3,9\%$  d'inhibition vs  $32,4 \pm 6,9\%$ ,  $p < 10^{-3}$ ) (figure 18B). Afin d'exclure un effet direct via l'inhibition d'IDO dans les LT, nous avons réalisé la même expérience sur des LT cultivés seuls. Cet inhibiteur n'a ici aucun effet sur des LT cultivés seuls (figure 18C). Il est également intéressant de voir que l'utilisation du 1-MT combinée à celle de l'anti-TGF $\beta$  bloquant rétablit d'autant plus la prolifération des LT ( $51,3 \pm 3,9\%$  d'inhibition vs  $12,3 \pm 4,5\%$ ,  $p < 10^{-3}$ ) (figure 18B). Comme décrit au cours de l'introduction, il est démontré qu'IDO puisse induire *in vitro* des Tregs Foxp3<sup>+</sup>. Nous nous sommes donc posé la question de l'impact d'IDO sur la génération de Tregs en culture. Nous avons analysé l'induction de Tregs CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en présence du 1-MT et/ou de l'anticorps anti-TGF $\beta$  bloquant en coculture par comparaison aux cultures de LT seuls. Nous avons constaté une diminution dans la génération de Tregs Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> aussi bien avec le 1-MT que l'anti-TGF $\beta$  bloquant ( $48,6 \pm 2,1\%$  vs  $37,9 \pm 2,2\%$ ,  $p = 0,008$  et  $48,6 \pm 2,1\%$  vs  $41,9 \pm 1,7\%$ ,  $p = 0,008$ ) (figure 18D). De plus, l'utilisation conjointe de ces deux inhibiteurs est synergique car nous observons une diminution plus importante du pourcentage de Tregs Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ( $48,6 \pm 2,1\%$  vs  $26,9 \pm 0,6\%$ ,  $p = 0,008$ ) (figure 18D).

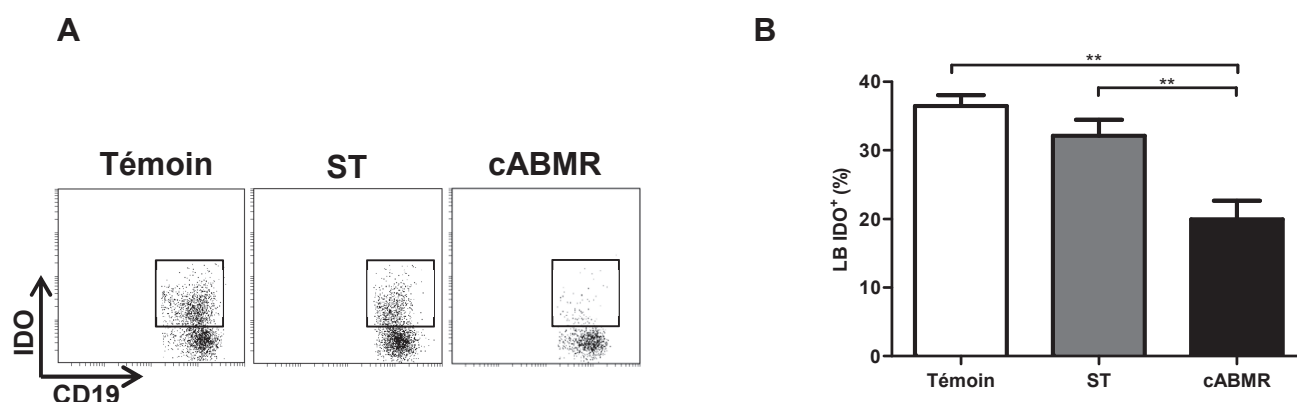


**Figure 18. La régulation B passe par un axe TGF/IDO en coculture.**

Les LT de volontaires sains (Témoin) sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours, en présence ou non de LB stimulés par CpG. La prolifération des LT est déterminée à l'aide du CFSE, et l'effet suppressif des LB est représenté par le pourcentage d'inhibition par rapport aux LT cultivés seuls. **(A)** : Dot plot représentatifs de l'expression d'IDO dans les LT et les LB à J0 et J4. Les cellules ont été perméabilisées, incubées avec un anti-IDO et un anti-CD19 puis analysées par cytométrie en flux. **(B)** : Inhibition de la prolifération des LT en coculture en présence de 5µg/mL d'anti-TGFβ bloquant, de 600µM de 1MT ou des deux. **(C)** : Mesure de la prolifération des LT seuls en culture de J3 à J5 avec ou sans 1MT (600µM). **(D)** : Fréquence des Tregs CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en coculture. Les cellules ont été perméabilisées, incubées avec un anti-Foxp3 et un anti-CD4 puis analysées par cytométrie en flux. \*p<0.05 ; \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; ns = non significatif.

### 3. Les LB des patients cABMR sont déficients dans la sécrétion en IDO

Suite au premier article, nous avons montré qu'il existe une absence d'inhibition de la prolifération des LT par les LB chez les patients cABMR. De plus, nous avons mis en évidence ici qu'IDO, sécrétée par les LB, est impliquée dans cette inhibition. Ces observations nous laissent penser que les LB des patients cABMR sont déficients dans la sécrétion de cette enzyme. Nous avons ainsi dans un premier temps vérifié l'expression de cette enzyme dans les LB de ces patients au jour 4 de coculture. Il est intéressant de voir que le pourcentage de LB positifs pour IDO est significativement diminué dans le groupe cABMR par rapport aux groupes Témoin et ST ( $19,9 \pm 2,7\%$  vs  $36,5 \pm 1,6\%$ ,  $p=0,001$  et  $19,9 \pm 2,7\%$  vs  $32,1 \pm 2,3\%$ ,  $p=0,004$ , respectivement) (figure 19A et 19B).



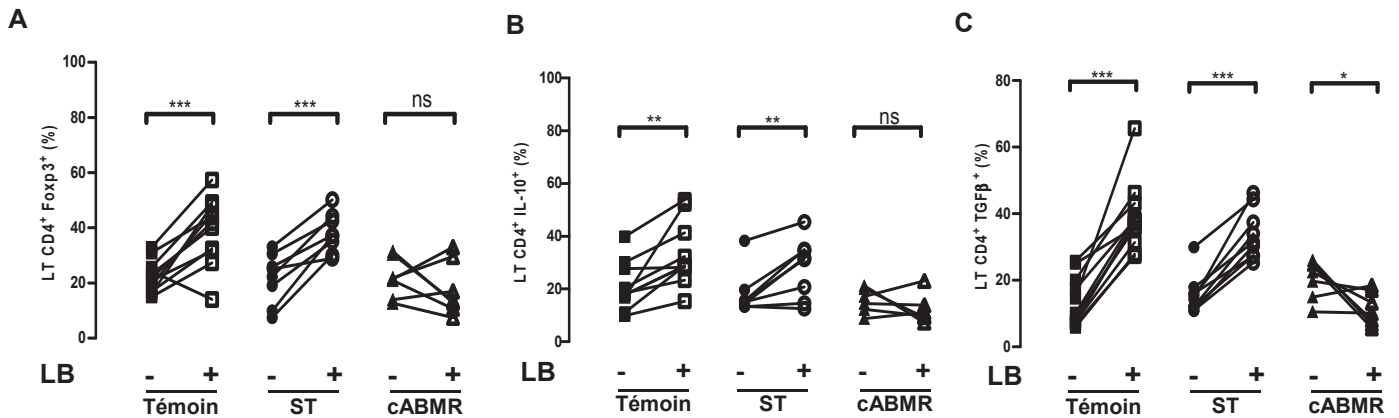
**Figure 19. Les LB de patients cABMR expriment faiblement IDO en coculture.**

Les LT de volontaires sains, de patients ST ou cABMR sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours, en présence ou non de LB stimulés par CpG ODN. Les cellules ont été perméabilisées, incubées avec un anti-IDO et un anti-CD19 puis analysées par cytométrie en flux. (A) : Dot plot représentatifs de l'expression d'IDO des LB à J4. (B) : Fréquence des LB positifs pour IDO à J4. \*\* $P < 0.01$ .



#### 4. Les LB des patients cABMR n'induisent pas de Tregs

Au vu du défaut d'induction d'IDO en culture par les LB de patients cABMR, nous avons ensuite cherché à savoir quelle est la conséquence de ce défaut sur la génération de Tregs *in vitro*. Nous avons ainsi analysé la présence de Tregs naturels (Foxp3<sup>+</sup>), de Tr1 (IL-10<sup>+</sup>) et de Th3 (TGFβ<sup>+</sup>) en coculture. En présence de LB de témoins et de patients ST, nous observons une augmentation significative du pourcentage de Tregs CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> ( $p < 10^{-3}$ ), ce que l'on ne retrouve pas avec les LB de patients cABMR (figure 20A). De la même manière, nous observons une induction de Tregs sécréteurs d'IL-10 et de TGFβ chez les volontaires sains et les patients stables ( $p = 0,003$  et  $p = 0,008$ , respectivement pour les Tr1 et  $p < 10^{-3}$  pour les Th3), tandis que les LB de patients cABMR n'induisent pas ces populations et inhibent même les Th3 ( $p = 0,34$  pour les Tr1 et  $p = 0,04$  pour les Th3) (figure 20B et 20C). Finalement, nous montrons que les LB de patients cABMR n'ont pas la capacité à générer des Tregs en coculture.



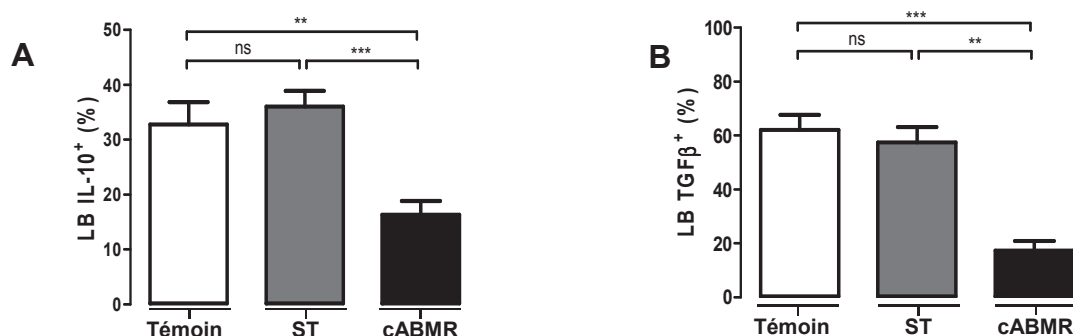
**Figure 20. Les LB des patients cABMR sont incapables de générer des Tregs.**

Les LT de volontaires sains (Témoin), de patients ST ou cABMR sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours, en présence ou non de LB stimulés par CpG ODN. (A) : Les cellules ont été perméabilisées, incubées avec un anti-Foxp3 et un anti-CD4 puis analysées par cytométrie en flux. (B) et (C) : Les cellules ont été perméabilisées, incubées avec un anti-IL-10 ou un anti-TGFβ associé à un anti-CD4, puis analysées par cytométrie en flux. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; ns = non significatif.

## 5. Les LB de patients cABMR sont déficients dans leur sécrétion en IL-10 et en TGFβ

Comme évoqué précédemment, le TGFβ est un inducteur d'IDO. Par ailleurs, cette cytokine ainsi que l'IL-10 sont impliquées dans les mécanismes de régulation par le LB dans notre modèle. Nous avons donc cherché à connaître le niveau d'expression de ces deux cytokines par le LB en coculture.

Par cytométrie en flux, nous pouvons voir qu'il y a moins de LB producteurs d'IL-10 et de TGFβ chez les patients cABMR par rapport aux volontaires sains et aux patients stables ( $16,3 \pm 2,5\%$  vs  $32,77 \pm 4,1\%$ ,  $p=0,003$  et  $16,3 \pm 2,5\%$  vs  $36,0 \pm 2,9\%$ ,  $p<10^{-3}$ , respectivement pour les LB IL-10<sup>+</sup> et  $17,3 \pm 3,7\%$  vs  $62,1 \pm 5,6\%$ ,  $p<10^{-3}$  et  $17,3 \pm 3,7\%$  vs  $57,5 \pm 5,7\%$ ,  $p=0,006$ , respectivement pour les LB TGFβ<sup>+</sup>) (figure 21A et 21B). Au final, les LB des patients cABMR sont déficients dans leur sécrétion d'IL-10 et de TGFβ.



**Figure 21. Les LB des patients cABMR expriment faiblement l'IL-10 et le TGFβ en coculture.**

Les LT de volontaires sains (Témoin), de patients stables (ST) ou cABMR sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours, en présence ou non de LB stimulés par CpG ODN. (A) et (B): Les cellules ont été perméabilisées, incubées avec un anti-IL-10 ou un anti-TGFβ associé à un anti-CD19 puis analysées par cytométrie en flux. \*\* $p<0.01$  ; \*\*\* $p<0.001$  ; ns = non significatif.

## IV. Conclusion

Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation des LT par les LB dans notre modèle de coculture. Chez des volontaires sains, deux cytokines majeures, sécrétées par les LB notamment, jouent deux rôles distincts sur les LT. L'IL-10 inhibe la différenciation des LT en Th1 tandis que le TGFβ inhibe la prolifération des LT. Par ailleurs, nous montrons pour la première fois que l'enzyme IDO est sécrétée par le LB

et impliquée dans l'inhibition de la prolifération des LT. En outre, dans le groupe cABMR, les LB sont déficients dans leur sécrétion d'IL-10, de TGF $\beta$  et d'IDO. De plus, leurs LB n'induisent pas de Tregs en coculture à l'inverse des LB de patients stables et de volontaires sains. Nous montrons ainsi pour la première fois l'importance d'un axe régulateur TGF $\beta$ /IDO dans la régulation de la prolifération des LT par les LB, un axe qui semble déficient chez les patients cABMR.

**CARACTERISATION DES  
POPULATIONS DE LB DANS LE  
REJET CELLULAIRE AIGU**

## I. Introduction

Notre étude sur le rejet humoral chronique nous a permis de mettre en évidence une distribution anormale dans le sang périphérique de ces patients ainsi qu'un défaut de régulation B. En parallèle de cette étude, nous avons étudié le compartiment B dans le rejet cellulaire aigu (ACR) ainsi que l'inhibition de la prolifération des LT par les LB issu de ces patients.

Les premiers résultats présentés ici nous montrent que chez les patients ayant développé un rejet cellulaire aigu, la distribution des LB est similaire à celle des patients stables dans le sang périphérique. De plus, ces LB de patients ACR inhibent la prolifération des LT, à l'instar des LB du groupe témoin et du groupe stable.

C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse d'une réaction très localisée au niveau du greffon lors du rejet cellulaire aigu, réaction qui n'a pas le temps de se développer en périphérie du fait que ce soit un rejet très précoce. Afin de se rendre compte de l'implication du LB dans ce rejet, nous avons donc dans un second temps, étudié des coupes de biopsies de patients ACR pour essayer de caractériser la nature des LB dans ce phénomène.

## II. Matériel et méthodes

### 1. Groupes d'étude

Nous avons étudié deux groupes de patients transplantés rénaux. Tous les patients et les volontaires sains inclus dans l'étude ont donné leur consentement et font partie d'un cadre éthique défini par l'établissement hospitalo-universitaire de Brest.

Les critères d'inclusion établis pour le groupe de patients stables (ST) sont les mêmes que ceux des deux précédentes études.

Les patients inclus dans le groupe **de rejet cellulaire aigu (ACR)** présentent des critères histologiques de rejet cellulaire conformément à la classification de Banff. Les prélèvements sanguins ont été effectués avant tout traitement spécifique du rejet cellulaire tel que des bolus de corticostéroïdes ou une modification du traitement d'entretien. Les caractéristiques immunologiques des patients sont décrites en tableau 10.

## 2. Culture cellulaire

Les cultures cellulaires ainsi que l'étude de la prolifération des LT ont été réalisées selon les mêmes conditions que lors des deux premiers articles.

## 3. Cytométrie

Afin d'étudier l'expression des marqueurs de surface sur les LB, l'analyse par cytométrie a été réalisée sur du sang frais obtenu durant les visites de routine des patients et également lors des cocultures cellulaires. Tous les anticorps utilisés sont indiqués dans le tableau suivant.

Anticorps	Spécificité	Hôte	Conjugué	Isotype	Fournisseurs
Anti-CD27	Homme	Souris	PE	IgG1	Beckman Coulter
Anti-IgD	Homme	Souris	FITC	IgG1	BD Biosciences
Anti-CD24	Homme	Souris	PE	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD5	Homme	Souris	FITC	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD38	Homme	Souris	PC5	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD19	Homme	Souris	PC7	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD19	Homme	Souris	PC5	IgG1	Beckman Coulter
Anti-HLA-DR	Homme	Souris	PC7	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD4	Homme	Souris	PC7	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD8	Homme	Souris	PC5	IgG1	Beckman Coulter
Anti-CD45RA	Homme	Souris	FITC	IgG1	Beckman Coulter

*FITC : Isothiocyanate de fluorescéine ; PE : Phycoérythrine ; PC5 : Phycoérythrine-cyanine-5 ; PC7 : Phycoérythrine-cyanine-7.*

**Tableau 7. Anticorps utilisés en cytométrie.**

## 4. Microscopie

### 4.1. Immunofluorescence et microscopie confocale

Les biopsies rénales sont incorporées dans du milieu de montage pour cryotomie (composé OCT, Miles Laboratories), subissent une congélation flash dans de l'isopentane puis sont conservées à -80°C. Des coupes de 4µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat et sont déposées sur des lames SuperFrost (Microm). Les coupes sont alors marquées par immunofluorescence ou conservées à -80°C.

Les coupes sont fixées dans du PBS-paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15min, puis saturées dans une solution de PBS-BSA 4%. Après incubation avec les anticorps primaires (tableau 8), les coupes sont lavées puis incubées avec les Ac secondaires et/ou la streptavidine conjuguée au FITC ou à la Rhodamine Red-X (RRX). Après un nouveau lavage, le montage est réalisé entre lame et lamelle en utilisant de la glycérine. Les marquages sont analysés à l'aide d'un système d'imagerie confocale TCS-NT (Leica). Les différents contrôles isotypiques ont été réalisés et se sont avérés négatifs.

Anticorps	Spécificité	Hôte	Conjugué	Isotype	Fournisseurs
Anti-CD20	Homme	Lapin		IgG	Thermo Fisher Scientific
Anti-CD3	Homme	Souris		IgG2a	Immunotech
Anti-IgD	Homme	Lapin	FITC	Fab'2	Dako
Anti-CD27	Homme	Souris	FITC	IgG1	BD Biosciences
Anti-CD38	Homme	Souris		IgG1	Immunotech
Anti-CD34	Homme	Chèvre		IgG	Santa Cruz
Anti-IgG	Souris	Ane	FITC	Fab'2	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG	Souris	Ane	RRX	Fab'2	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG	Lapin	Ane	FITC	Fab'2	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG	Lapin	Ane	RRX	Fab'2	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG	Goat	Ane	Cy5	IgG	Abcam

*FITC : Isothiocyanate de fluorescéine ; TRITC : Tetra methyl Rhodamine Isothiocyanate ; RRX : Rhodamine Red-X.*

**Tableau 8. Anticorps utilisés en microscopie confocale.**

### 4.2. Immunohistochimie *in situ*

Les marquages immunohistochimiques sont réalisés sur des coupes de biopsies rénales incluses en paraffine. Toutes les étapes ont été effectuées au laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Brest à l'aide d'un automate Benchmark XT (Ventana Medical Systems, USA).

La révélation des marquages a été faite par le kit *ultraView Universal DAB Detection Kit* (Ventana Medical Systems) permettant une révélation par la diaminobenzidine (DAB), substrat qui donne un précipité brun. Les marquages sont analysés à l'aide d'un microscope photonique (Leica, Allemagne). L'anticorps utilisé ici est un anti-CD45, Antigène Leucocytaire Commun (ALC) de souris (Dako). Les différents contrôles isotypiques ont été réalisés et se sont avérés négatifs.

## **5. Analyses statistiques**

Les données statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5, en utilisant soit le test non paramétrique Mann-Whitney, soit le t-test apparié, et exprimées par l'erreur standard de la moyenne. Lorsque  $p < 0,05$ , la différence est considérée comme significative.



**Tableau 9. Caractéristiques immunologiques des patients ayant développé un rejet cellulaire aigu (ACR)**

Patient	Néphropathie initiale	Thérapie d'induction	Traitement d'entretien	Temps depuis la transplantation (mois)	Stade du rejet	créatininémie (umol/L)	protéinurie (g/24h)
ACR 1	IgA	IL2R	Cs/MPA	1	grade 2A	210	0.24
ACR 2	PKD	IL2R	Cs/MPA	3	grade 1A	122	0.14
ACR 3	PKD	IL2R	Cs/MPA	4	Borderline	170	0.60
ACR 4	Goodpasture	IL2R	Cs/MPA	3	grade 1A	123	0.52
ACR 5	Dysplasie	IL2R	Cs/MPA	4	Borderline	147	0.29
ACR 6	HSF	IL2R	Cs/MPA	3	grade 1B	141	0.13
ACR 7	PKD	IL2R	Cs/MPA	2	grade 1A	138	0.19
ACR 8	NTIC	IL2R	Cs/MPA	30	grade 1A	232	0.50
ACR 9	Diabétique	IL2R	Cs/MPA	3	grade 1B	127	0.20
ACR 10	Dysplasie	IL2R	Cs/MPA	3	grade 2A	91	0.49
ACR 11	HSF	IL2R	Cs/MPA	14	grade 1A	114	0.06
ACR 12	Indéterminée	Thymo	Cs/MPA	5	grade 1A	150	0.40
ACR 13	PKD	IL2R	Cs/MPA	2	Borderline	177	0.14
ACR 14	PKD	IL2R	Cs/MPA	5	grade 1A	279	0.33

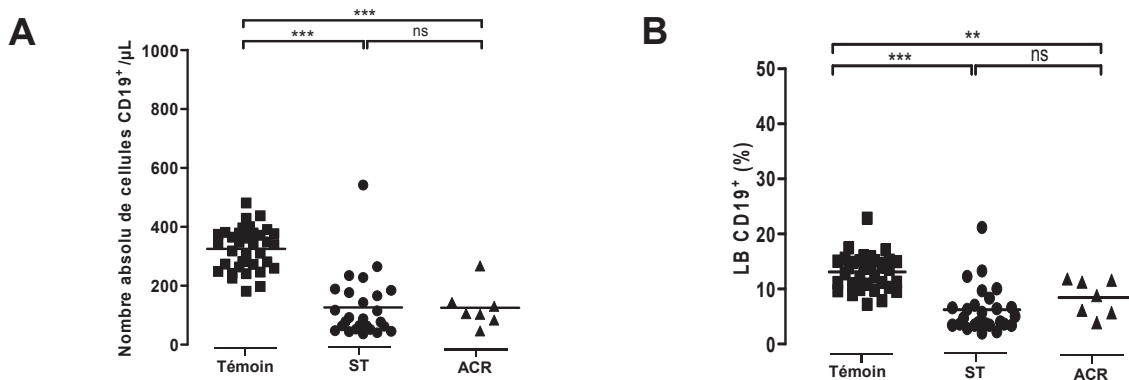
Cs : corticostéroïdes ; HSF : Hyalinose segmentaire et focale ; IgA : Néphropathie à IgA ; IL2R : anticorps anti-IL2 récepteur ; MPA : Acide Mycophénolique ; NTIC : Néphropathie tubulointerstitielle chronique ; PKD : Polykystose hépato-rénale autosomique dominante ; Thymo : thymoglobulines

### III. Résultats

#### 1. Les sous-populations de LB des patients ACR ne présentent pas de défaut de distribution

##### 1.1. Les lymphocytes B

A l'instar du cABMR, nous avons réalisé un phénotypage par cytométrie en flux des LB du sang périphérique de patients ayant développé un rejet cellulaire aigu (ACR), de patients avec une fonction rénale stable (ST) ainsi que de volontaires sains (Témoin). De la même manière que dans les groupes cABMR et ST, les patients ACR présentent une réduction importante en pourcentage et en nombre absolu des LB circulants par rapport aux volontaires sains ( $8,5 \pm 1,2\%$  vs  $13,1 \pm 0,5\%$ ,  $p=0,006$  et  $125,3 \pm 26,3$  cellules/ $\mu\text{L}$  vs  $325,4 \pm 12,2$  cellules/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 10^{-3}$ , respectivement) (figure 22A et 22B).

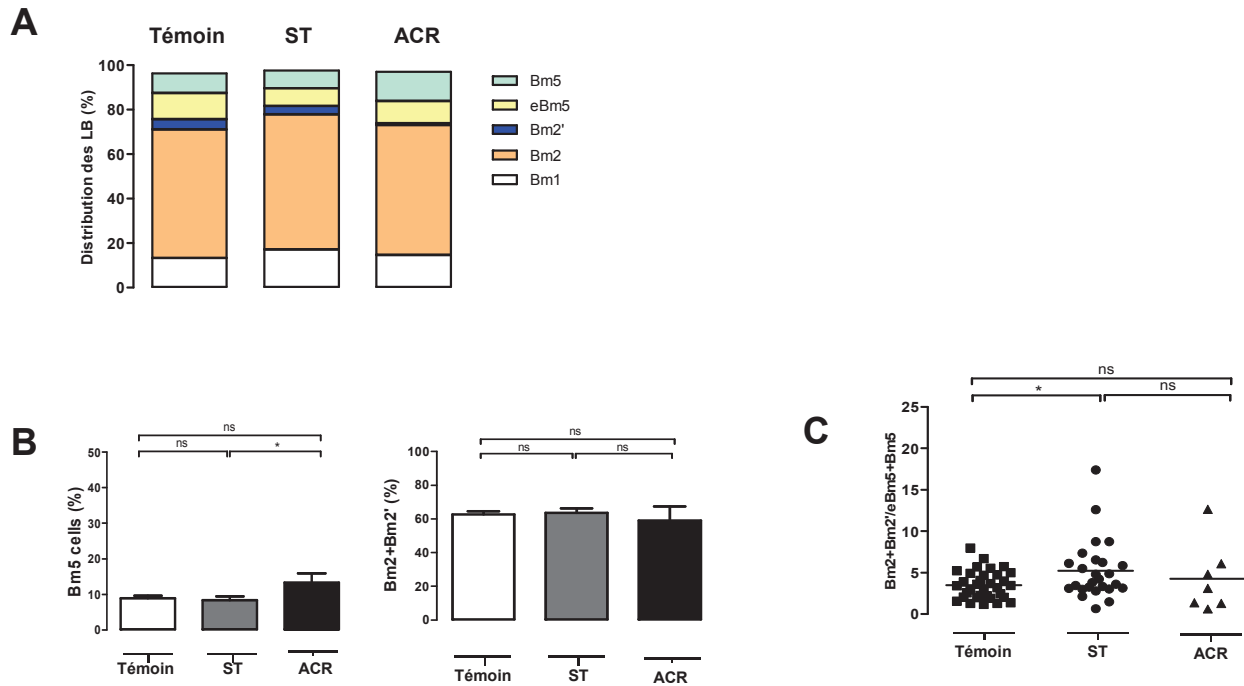


**Figure 22. Analyse de la population de LB CD19<sup>+</sup> dans le sang périphérique.**

Réalisée chez des patients ACR, ST et des volontaires sains (Témoin) par cytométrie en flux. (A) : Nombre absolu de LB du sang périphérique en LB/ $\mu\text{L}$  dans les différents groupes. (B) : Fréquence des LB CD19<sup>+</sup> parmi les lymphocytes circulants. \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; ns = non significatif.

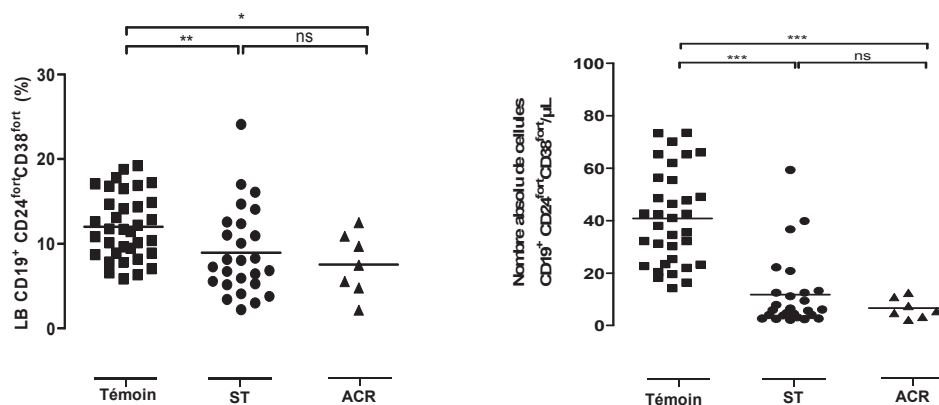
Nous nous sommes ensuite intéressés plus en détail aux populations de LB matures à l'aide du double marquage IgD/CD38 dans la population CD19<sup>+</sup>. Le groupe ACR présente un taux de LB activés (Bm2+Bm2') similaire au groupe ST ( $59,1 \pm 8,3\%$  vs  $63,6 \pm 2,7\%$ ,  $p=0,6$ ) et un pourcentage de LB mémoire Bm5 significativement plus élevé par rapport au groupe stable ( $13,3 \pm 2,6\%$  vs  $8,4 \pm 1,1\%$ ,  $p=0,04$ ) (figure 23A, 23B). Cependant, contrairement aux patients cABMR ( $2,1 \pm 0,4$  vs  $5,2 \pm 0,7$ ,  $p=0,002$ ), la représentation du ratio « LB activés/ LB

mémoires » nous montre qu'il n'existe pas de différence significative dans le compartiment de LB matures entre patients ACR et patients ST ( $4,3 \pm 1,5$  vs  $5,2 \pm 0,7$ ,  $p=0,3$ ) (figure 23C).



**Figure 23. Analyse des différentes sous-populations de LB matures dans le sang périphérique.**

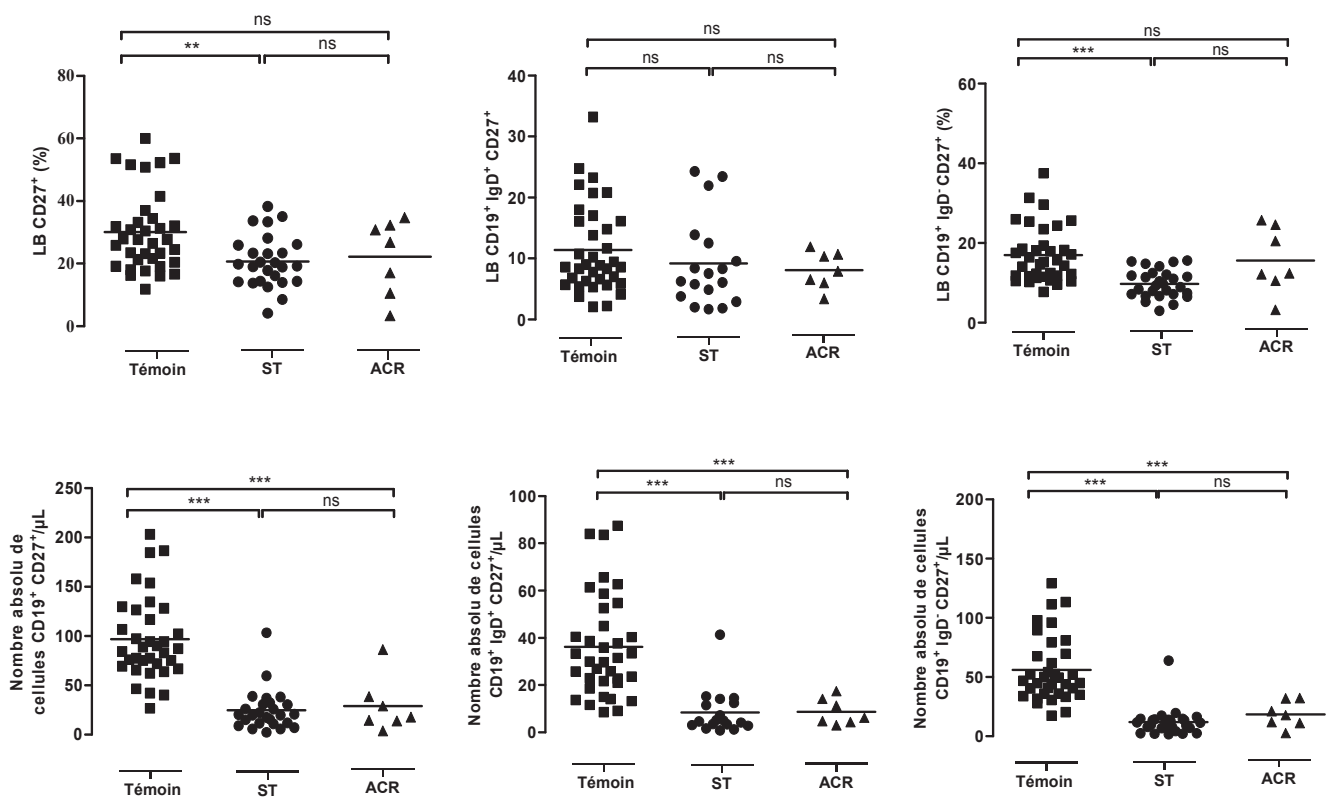
Réalisée chez des patients ACR, ST et des volontaires sains (Témoin). (A) : Distribution en pourcentage des LB des cinq sous-populations de LB matures. (B) : Fréquence des Bm2+Bm2' et des Bm5 pour les trois groupes. (C) : Ratio Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5. \* $p<0.05$  ; ns = non significatif.



**Figure 24. Analyse de la distribution des sous-populations de LB transitionnels dans le sang périphérique.**

Réalisée chez des patients ACR, ST et des volontaires sains (Témoin). Fréquence et nombre absolu des LB transitionnels CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup> dans la population CD19<sup>+</sup>. \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0.01$  ; \*\*\* $p<0.001$  ; ns = non significatif.

De la même façon que dans l'étude sur le cABMR, nous nous sommes intéressés à la population de LB transitionnels, comprise dans les Bm2+Bm2'. Nous n'observons pas de différence de distribution, ni en fréquence ni en nombre absolu des LB transitionnels CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup> dans le groupe ACR par rapport au groupe ST (7,6±1,4% vs 8,9±1,0%, p=0,6 et 6,7±1,5 cellules/μL vs 11,8±2,7 cellules/μL, p=0,6, respectivement) (figure 24). Par ailleurs, ces résultats sont très différents de ceux obtenus dans le groupe cABMR où nous avons une diminution significative de cette population en pourcentage et en nombre de cellules par comparaison aux patients stables (2,5±0,4% vs 8,9±1,0%, p<10<sup>-3</sup> et 3,5±0,8 cellules/μL vs 11,8±2,7 cellules/μL, p=0,001, respectivement).



**Figure 25. La distribution des sous-populations de LB mémoires dans le sang périphérique.**

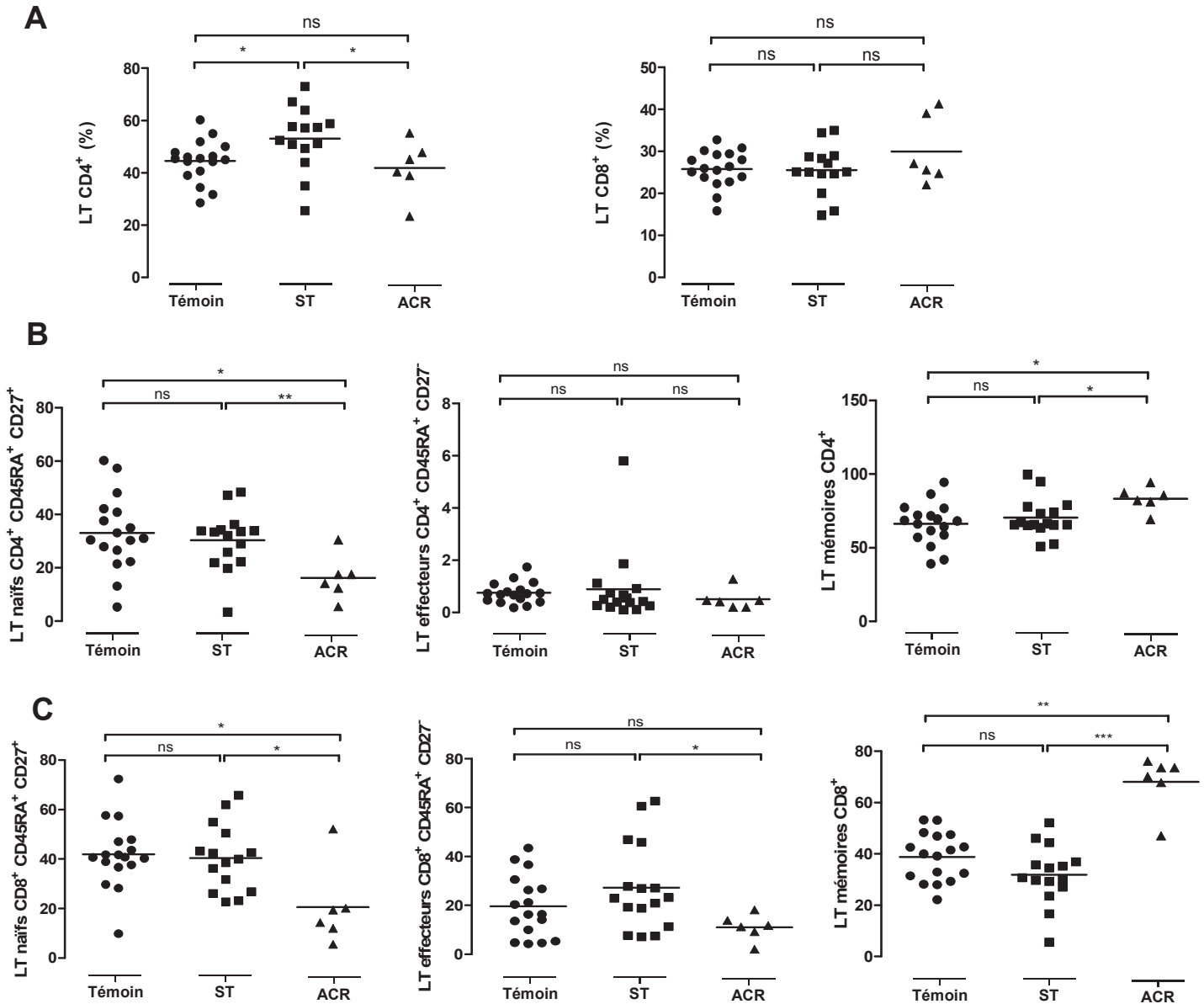
Réalisée chez des patients ACR, ST et des volontaires sains (Témoin). Fréquence et nombre absolu par μL de sang des populations CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> et CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>. \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; ns = non significatif.

Nous avons ensuite analysé l'expression du marqueur mémoire CD27 afin de confirmer les observations réalisées sur la population de LB Bm5. Aucune différence significative en fréquence et en nombre absolu n'est observée sur la population de LB CD19<sup>+</sup>

CD27<sup>+</sup> entre les groupes ACR et ST (p=0,7 et p=0,9 respectivement) (figure 25). De plus, en faisant référence à la dichotomie LB CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> (LB pré-switch) et LB CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> (LB post-switch) utilisée dans l'étude du cABMR, nous n'observons pas de différence de distribution de ces populations, que ce soit en pourcentage ou en nombre de cellules par rapport au groupe ST (p=0,7 et p=0,5 respectivement pour les LB pré-switch et p=0,06 et p=0,008 respectivement pour les LB post-switch) (figure 25). Finalement, le compartiment B mémoire n'est pas affecté dans le groupe ACR, contrairement au groupe cABMR. En effet, chez les patients cABMR, les LB CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> étaient fortement représentés par rapport aux patients stables (16,9±2,3% vs 9,7±0,7%, p=0,006 pour la fréquence et 25,0±4,1 cellules/μL vs 11,9±2,2 cellules/μL, p=0,002, pour le nombre absolu).

## 1.2. Les lymphocytes T

Enfin, comme pour le groupe cABMR, nous avons vérifié la distribution des LT du sang périphérique chez les patients ACR. De manière générale, nous observons une diminution des LT CD4<sup>+</sup> dans le groupe ACR par rapport au groupe stable alors que les LT CD8<sup>+</sup> ne présentent pas de différence significative (41,8±4,4% vs 53±3,3%, p=0,04 et 30,0±3,3% vs 25,6±1,6%, p=0,4, respectivement) (figure 26A). L'étude détaillée de ces populations de LT nous montre que les LT naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) sont plus faiblement représentés chez les patients ACR par rapport au groupe ST (16,2±3,4% vs 30,3±2,6%, p=0,009 et 20,6±6,7% vs 40,4±3,5%, p=0,01, respectivement) (figure 26B et 26C). Les LT effecteurs CD4<sup>+</sup> (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>) quant à eux ne présentent pas de différence de distribution entre le groupe ACR et le groupe ST tandis que les LT effecteurs CD8<sup>+</sup> sont diminués (11,1±2,2% vs 27,3±17,8%, p=0,03) (figure 26B et 26C). L'étude des populations de LT mémoires CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+/+</sup>) est très intéressante car nous pouvons voir que les pourcentages de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> mémoires sont significativement plus élevés chez les patients ACR par rapport aux patients stables (83,3±3,4% vs 70,4±3,2%, p=0,02 et 68,0±4,4% vs 31,8±2,9%, p<10<sup>-3</sup>, respectivement) (figure 26B et 26C). Pour conclure, les LT naïfs sont globalement diminués dans le groupe ACR tandis que les LT mémoires sont augmentés. Ces résultats sont différents du groupe cABMR qui ne présentait pas de différence de distribution des LT mémoires par rapport au groupe ST. Mais contrairement au groupe ACR, les patients cABMR montraient une augmentation significative des LT effecteurs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> par comparaison aux patients stables (7,2±2,9% vs 0,9±0,3%, p=0,001 et 44,2±4,4% vs 27,3±4,4%, p=0,007, respectivement).



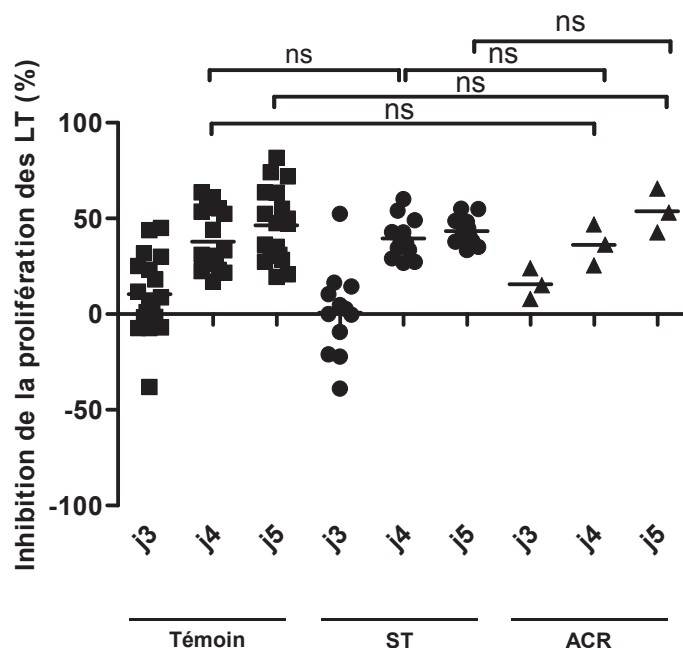
**Figure 26. La distribution des LT dans le sang périphérique.**

Réalisée chez des patients ACR, ST et des volontaires sains (Témoin). (A) : Pourcentage de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. (B) : Pourcentage de LT CD4<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>), effecteurs (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) et mémoires (CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+/-</sup>). (C) : Pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>), effecteurs (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) et mémoires (CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+/-</sup>). \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; ns = non significatif.

## 2. Les LB de patients ACR sont régulateurs

La distribution des LB des patients ACR étant proche de celle des témoins, nous avons voulu savoir si le LB de patient ACR possède la capacité de réguler la prolifération des LT. Nous avons ainsi réalisé des cocultures autologues LT/LB chez ces patients en ayant marqué

au préalable les LT par du CFSE, pour suivre leur prolifération. A l'instar des volontaires sains et des patients stables, le LB de patient ACR inhibe efficacement la prolifération des LT (figure 27). Le déséquilibre de distribution des LT chez les patients ACR n'a donc pas d'impact sur la régulation par le LB.



**Figure 27. Le LB dans le rejet cellulaire aigu inhibe la prolifération des LT.**

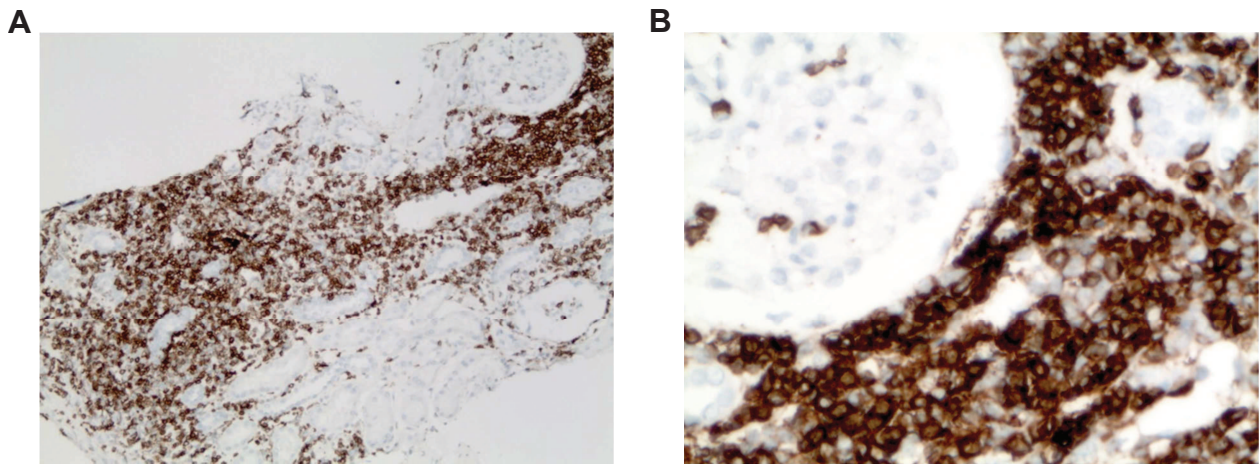
Les LT de patients ACR, ST et de volontaires sains (Témoin) sont marqués au CFSE puis stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 5 jours, en présence ou non de LB stimulés par CpG ODN. Expression en pourcentage de l'inhibition de la prolifération des LT par les LB de J3 à J5. ns = non significatif.

### 3. Caractérisation des LB de patients ACR sur coupes de biopsie

Les résultats précédents ont mis en évidence l'absence d'anomalies, quantitatives et qualitatives, des LB chez les patients ACR dans le sang périphérique. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux LB intragreffons afin de vérifier s'il existe un défaut B localisé. Ainsi, nous avons analysé des coupes de biopsies de patients ACR et ST, afin de caractériser les LB intragreffons. Ce travail, très préliminaire, n'a été effectué que sur un faible nombre de patients et demeure à l'heure actuelle de simples observations.

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence l'infiltration globale leucocytaire sur des coupes rénales de patients ACR. Nous avons réalisé un marquage à l'aide d'un anticorps anti-CD45-ALC par immunohistochimie qui permet de marquer tous les leucocytes (figure 28). La révélation a été effectuée *via* un kit de détection par DAB et les contrôles isotypiques réalisés au sein du laboratoire d'anatomopathologie sont négatifs. Nous

pouvons ainsi observer qu'il semble exister un important infiltrat de leucocytes diffus (en brun), particulièrement présent au pourtour des glomérules, au sein des biopsies des patients ACR.

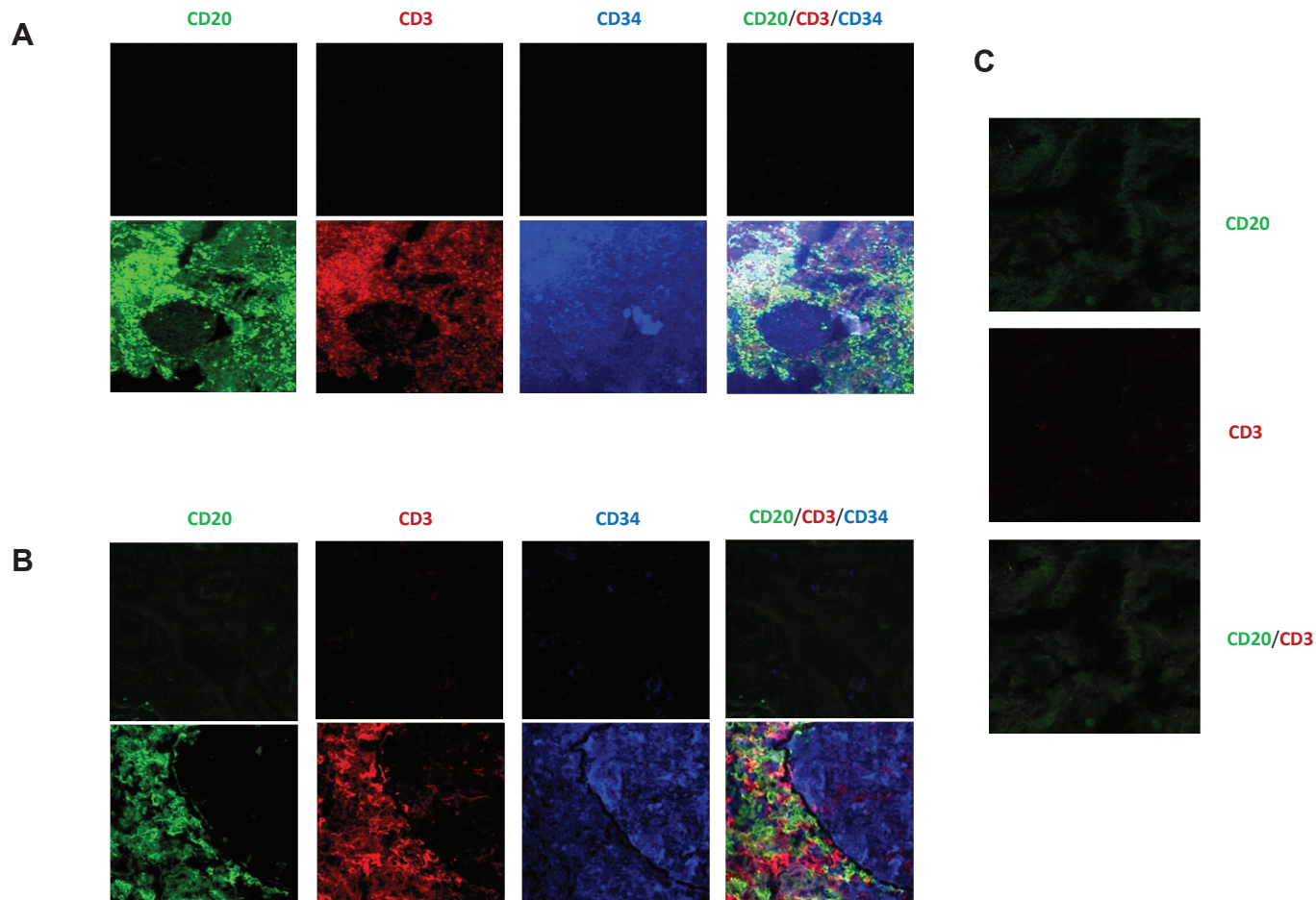


**Figure 28. Images représentatives de l'infiltrat cellulaire par immunohistochimie sur des coupes de biopsies de patients ACR.**

Les images sont prises au grossissement x10 (A) et x40 (B). (A) et (B) : Le marquage est réalisé à l'aide d'un anticorps anti-CD45-ALC et la révélation a été effectuée avec un kit de détection par DAB.

Afin de caractériser plus en détail les populations leucocytaires infiltrées, nous avons ensuite réalisé un triple marquage CD20/CD3/CD34 par immunofluorescence pour identifier les LB (CD20) et les LT (CD3), ainsi que les cellules rénales (CD34). Nous avons également vérifié s'il existe un infiltrat de LB et de LT chez le patient stable. L'analyse a été réalisée par microscopie confocale. Les premiers résultats semblent faire état d'un large infiltrat de LT marqués par le CD3 en rouge et de LB marqués par le CD20 en vert, chez les patients ACR tandis que les patients stables sont négatifs pour ces marqueurs (figure 29). Il est intéressant de noter que les infiltrats sont majoritairement localisés à proximité des glomérules, dont la localisation anatomique est facilitée ici par un marquage anti-CD34 (bleu), se fixant spécifiquement sur les cellules rénales et dont la fluorescence est d'autant plus forte dans le glomérule.

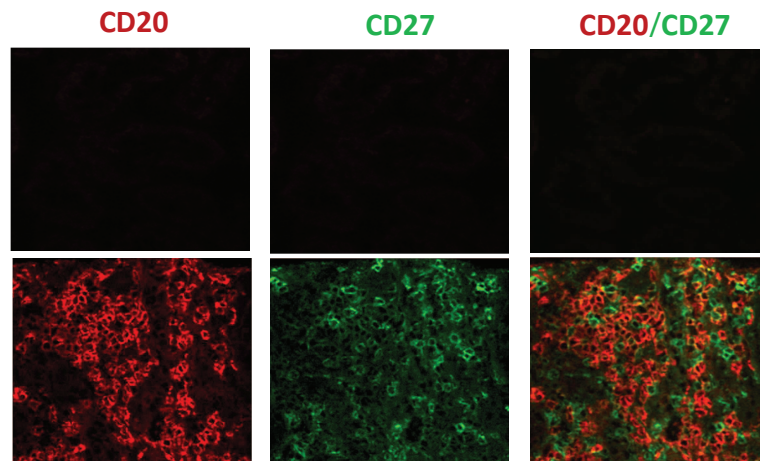




**Figure 29. Images représentatives de l'infiltrat de LT et de LB par immunofluorescence sur des coupes de biopsies de patients ACR et ST.**

Les images sont prises au grossissement x16 (A) et x63 (B et C). (A) et (B) : Marquage du CD20 en vert, du CD3 en rouge, du CD34 en bleu et superposition des marquages sur une coupe de biopsie de patient ACR. Les images en haut représentent les contrôles isotypiques. (C) : Marquage du CD20 et du CD3 sur une coupe de biopsie de patient ST.

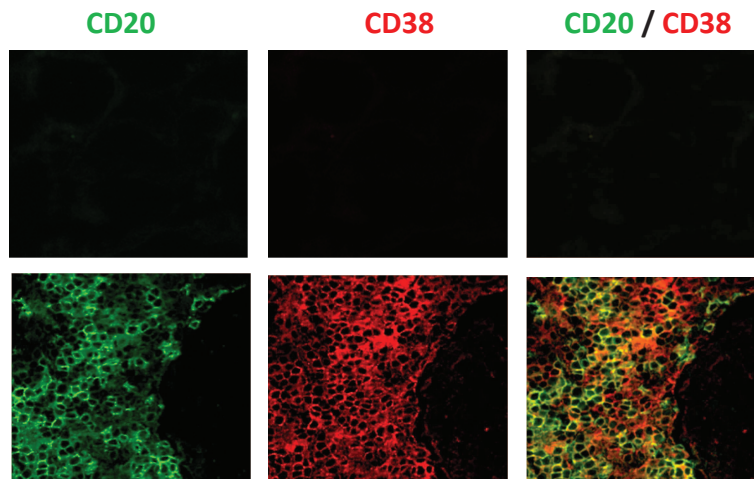
Nous avons ensuite essayé de caractériser plus précisément la nature des LB infiltrant ces biopsies. Nous avons tout d'abord analysé la présence de LB mémoires  $CD20^{+} CD27^{+}$  par microscopie confocale au sein de nos coupes. Ce marqueur semble être exprimé mais aucune co-localisation avec les LB ne parait se démarquer (figure 30). Les lames analysées ici ne semblent pas présenter de LB mémoires  $CD27^{+}$  chez les patients ACR, mais ce résultat demande à être confirmé.



**Figure 30. Images représentatives du marquage CD20/CD27 par immunofluorescence sur des coupes de biopsies de patients ACR.**

Les images sont prises au grossissement x63. Marquage du CD20 en rouge, du CD27 en vert et superposition des marquages sur une coupe de biopsie de patient ACR. Les images en haut représentent les contrôles isotypiques.

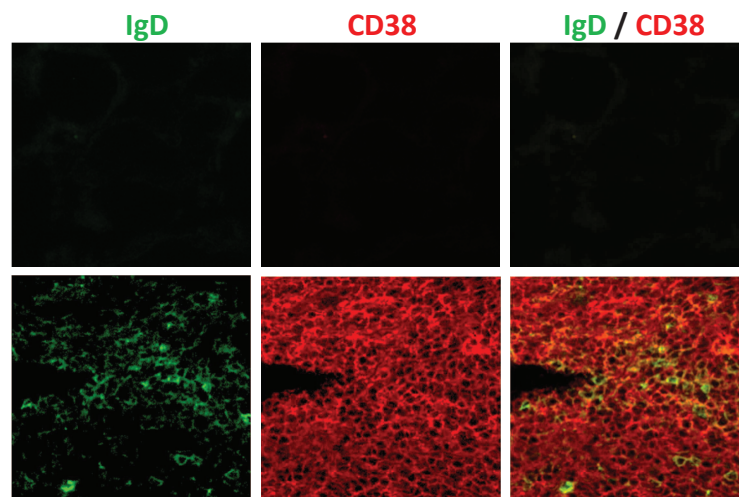
L'état d'activation des LB présents dans l'infiltrat peut être mis en évidence par l'appréciation du marqueur CD38. Ainsi, nous avons réalisé un double marquage CD20/CD38. La majeure partie des LB chez les patients ACR semblent être positifs pour le CD38 (figure 31).



**Figure 31. Image représentative du marquage CD20/CD38 par immunofluorescence sur des coupes de biopsies de patients ACR.**

Les images sont prises au grossissement x63. Marquage du CD20 en vert, du CD38 en rouge et superposition des marquages sur une coupe de biopsie de patient ACR. Les images en haut représentent les contrôles isotypiques.

L'expression du CD38 par les LB infiltrés chez les patients ACR nous a amené à nous intéresser aux différentes sous-populations de LB matures. L'étape suivante a donc été de vérifier la présence de l'IgD sur ces LB par un double marquage IgD/CD38 comme nous l'avions fait dans le sang périphérique. Nous observons très peu de cellules IgD qui colocalisent avec le CD38 (figure 32).



**Figure 32. Image représentative du marquage IgD/CD38 par immunofluorescence sur des coupes de biopsies de patients ACR.**

Les images sont prises au grossissement x63. Marquage de l'IgD en vert, du CD38 en rouge et superposition des marquages sur une coupe de biopsie de patient ACR. Les images en haut représentent les contrôles isotypiques.

Les différents marquages ont été réalisés chez 12 patients ACR qui présentent différents grades de rejet (tableau 11). Malgré le faible nombre de patients inclus dans cette étude pour le moment, nous pouvons tout de même regrouper certaines observations, qui demandent à être confirmées. Globalement, il semblerait que la majorité des biopsies présentent une infiltration lymphocytaire (10/12 patients) qui varie selon les patients. Ces variations paraissent être liées au stade du rejet. Par ailleurs, les infiltrats se regroupent plutôt en agrégats au pourtour des glomérules dans les rejets de premiers grades tandis que la localisation cellulaire est plus diffuse dans les rejets avancés. Il est intéressant de noter que la plupart des LB des patients ACR sont CD38<sup>+</sup>. Cependant, il semble y avoir davantage de LB IgD<sup>+</sup> dans les rejets de plus haut grade (IIA). Ces résultats suggèrent que le nombre de LB activés augmentent avec l'intensité du rejet mais une cohorte plus importante de patients est nécessaire pour conclure sur ces marquages. Par ailleurs, nous ne détectons jamais de LB

CD27<sup>+</sup> sur ces biopsies, ce qui peut également s'expliquer par le faible nombre de biopsies analysées.

Patient	Stade du rejet	Nature de l'infiltrat	Localisation	LB CD27 <sup>-</sup>	LB CD38 <sup>+</sup>	LB IgD <sup>+</sup>
ACR 1	grade IIA	LB++/LT++	Diffuse	OUI	OUI	++
ACR 2	grade IA	-	-	Ø	-	-
ACR 3	borderline	LB++/LT++	Diffuse	Ø	OUI	++
ACR 4	grade IA	LB+/LT++	Agrégats	Ø	-	-
ACR 5	borderline	-	-	Ø	-	-
ACR 6	grade IB	LB+/LT++	Agrégats	Ø	OUI	-
ACR 7	grade IA	LB+/LT+	Agrégats	OUI	OUI	+
ACR 8	grade IA	LB+/LT++	Agrégats	OUI	OUI	+
ACR 9	grade IB	LB+/LT++	Agrégats	Ø	OUI	-
ACR 10	grade IIA	LB++/LT++	Diffuse	OUI	OUI	++
ACR 11	grade IA	LB+/LT+	Agrégats	OUI	OUI	+
ACR 12	grade IA	LB+/LT+	Agrégats	OUI	OUI	++

OUI : présence ; Ø: non effectué ; - : absence de marquage ; + : faible quantité ; ++ : forte quantité.

**Tableau 10. Tableau récapitulatif du phénotype des LB chez les patients ACR.**

## IV. Conclusion

Nous avons tout d'abord montré ici, que contrairement au rejet humoral chronique, les patients qui développent un rejet cellulaire aigu ne présentent pas de déséquilibre de distribution des LB. Ainsi, alors qu'il existe une anomalie phénotypique des LB dans le cABMR, caractérisé par une prédominance des LB mémoires au détriment des LB au potentiel régulateur, le groupe ACR présente une répartition de ces populations similaire au groupe ST. Cependant, il existe une différence de distribution des LT, en particulier une diminution des LT naïfs et une augmentation des LT mémoires chez les patients ACR tandis que nous avons montré plutôt un taux élevé de LT effecteurs dans le cABMR. En outre, nous avons également démontré que les LB des patients ACR ont conservé leurs propriétés régulatrices comme le démontre l'efficacité des LB à inhiber la prolifération des LT en coculture.

Ainsi, les LB du compartiment sanguin sont sensiblement identiques à ceux des patients stables, ce qui nous a permis d'évoquer l'hypothèse d'un problème plus local dans le rejet cellulaire. Nous avons ainsi démarré une étude qui reste à un stade très préliminaire, avec un faible contingent de patients, sur des biopsies de patients ACR. Les premières observations nous laissent penser qu'il existe une infiltration importante de LB et de LT au sein du greffon,

cellules non retrouvées sur les coupes du groupe stable. Une analyse plus détaillée de ces populations nous a ensuite conduits à chercher à mettre en évidence divers marqueurs sur les LB. Ainsi, les LB infiltrés semblent être globalement activés CD27<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup> IgD<sup>+/-</sup>. Cependant, ces résultats restent préliminaires et constituent seulement de simples observations qui demandent à être confirmés sur un panel plus large de patients ACR.

# **ETUDE DE L'INFLUENCE DU LYMPHOCYTE B SUR LE TH17**

## **I. Introduction**

Au cours de la réaction de rejet, il existe une infiltration importante de cellules immunitaires, que ce soit de LT ou de LB. Dans le rejet cellulaire, la présence de Th17 a été démontrée et semble jouer un rôle important dans le processus de rejet. Même si actuellement les fonctions des Th17 ne sont pas totalement élucidées chez l'Homme, ces cellules sont connues pour être des médiatrices de l'inflammation locale, par la sécrétion de cytokines telle que l'IL-17 notamment.

La coopération LB/Th17 reste encore peu connue chez l'Homme. Pourtant, les LB étant connus pour sécréter les différentes cytokines indispensables à la polarisation en Th17, et connaissant notamment le pouvoir régulateur des LB sur les LT, l'objectif a été d'étudier plus en détail l'effet du LB sur les Th17. Pour ce faire, nous avons dû mettre en place un modèle *in vitro* de différenciation en Th17. Cependant, il est difficile d'établir un consensus quant aux différentes conditions nécessaires pour générer des Th17. Ainsi, quatre cytokines se démarquent dans la littérature, l'IL-6, le TGF $\beta$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-21 (Acosta-Rodriguez et al. 2007; Wilson et al. 2007; Flores-Borja et al. 2013), et nous ont servies de base pour la mise au point du modèle *in vitro*.

## **II. Matériel et méthodes**

### **1. Groupe d'étude**

Toutes les expériences ont été réalisées sur du sang de volontaires sains qui ont donné leur consentement et font partie d'un cadre éthique défini par l'établissement hospitalo-universitaire de Brest.

### **2. Culture cellulaire**

#### **2.1. Isolation des cellules à partir du sang périphérique**

Les cellules lymphocytaires B et T ont été isolées selon le protocole décrit dans les premiers articles. Par ailleurs, dans cette étude, les LT sont purifiés à l'aide du kit de sélection négative *Human naïve CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Cocktail* Easy Step (StemCell Technologies) afin de garder seulement les LT CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>. Leur pureté est supérieure à 98%.



## 2.2. Conditions de culture

Les LT CD4<sup>+</sup> isolés et purifiés du sang périphérique de volontaires sains sont cultivés en plaque 96 puits, coatée avec une IgG de chèvre anti-souris (Jackson ImmunoResearch) à 10 µg/mL, à une concentration finale de  $4 \cdot 10^4$  cellules/mL pendant 7 jours. Les LT sont stimulés par un anti-CD3 (Biolegend, CA) à 0,2 µg/mL et un anti-CD28 (Beckman Coulter) à 0,2 µg/mL +/- IL-6 (Immunotools) à 30ng/mL et TGFβ (Immunotools) à 10ng/mL. Pour les expériences de coculture, les LB sont ajoutés à un ratio 1 :1. Les LB sont en outre stimulés par du CpG ODN de type B n°2006 préparé à une concentration finale de 0,25 µM.

## 3. Analyse de l'expression des messagers

### 3.1. Extraction des acides ribonucléiques (ARN)

L'ARN total est extrait à l'aide du kit RNable (Eurobio) adapté aux petites quantités de cellules (<10<sup>6</sup> cellules). Les culots cellulaires sont repris dans 800µL de tampon de lyse auxquels sont ajoutés 160µL de chloroforme. Le mélange est vortexé et laissé dans la glace pendant 15min, puis centrifugé pendant 45min à 14000g à 4°C. La phase aqueuse supérieure contenant l'ARN est récupérée et précipitée dans un volume d'éthanol absolu pendant une nuit à -20°C. Le précipitat d'ARN est collecté après une centrifugation de 30min à 14000g à 4°C. L'ARN est ensuite lavé deux fois avec de l'éthanol froid à 70%, séché à l'air libre puis repris dans de l'eau di-éthyl pyro-carbonate (DEPC) (Sigma). Cet ARN est enfin dosé par spectrophotométrie s'assurant ainsi d'un ratio DO 260nm/DO 280nm proche de 2. Les ARN sont conservés à -80°C.

### 3.2. Rétrotranscription (RT) de l'ARN

L'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) est synthétisé par la technique de « random priming » dans un volume final de 20µL. 2µg d'ARN est incubé avec 150ng d'hexanucléotides (Invitrogen) et 10mM de déoxynucléotides triphosphates dNTPs (Invitrogen) à 65°C pendant 5min. Après une minute de refroidissement dans la glace, 200mM de dithiothréitol (DTT) et du tampon de réaction sont ajoutés à l'ARN. 100U de transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen) sont ensuite ajoutés après 2min d'incubation à température ambiante. Après 10 minutes d'incubation à 25°C et 50 minutes à 42°C, l'enzyme est inactivée par 15 minutes à 75°C. Le mélange d'ADNc est conservé à -20°C.



### 3.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

#### 3.3.1. PCR

La PCR est réalisée dans un mélange de 25µL contenant 50ng d'ADNc, 5µM d'amorces spécifiques sens et anti-sens (tableau 12), du MgCL<sub>2</sub>, des dNTPs, du tampon, le tout ajusté avec de l'eau pure. L'enzyme Taq polymérase est ensuite ajoutée au mélange. Pour chaque expérience, un témoin est réalisé ne contenant que de l'eau et le mélange réactionnel. La PCR consiste en 5min à 94°C, puis 5 cycles de 30sec à 94°C, 30sec à 65°C, 30sec à 72°C, suivi de 35 cycles de 30sec à 94°C, 30sec à 60°C, 30sec à 72°C, terminant par 10min à 72°C. Les produits de PCR ainsi obtenus sont mis à migrer sur un gel d'agar à 2%. La qualité du matériel génétique de chaque échantillon est vérifiée par l'analyse de l'expression de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

Primers	Références
IL-17A Sens	ACCAATCCCCAAAAGGTCCTC
IL-17A antisens	GGGGACAGAGTTCATGTGGT
RORc sens	TTTCCGAGGATGAGATTGC
RORc antisens	CTTCCACATGCTGGCTACA
GAPDH sens	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH antisens	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

**Tableau 11. Amorces utilisées en PCR**

#### 3.3.2. PCR quantitative (PCRq)

La PCR quantitative en temps réel est réalisée en duplicat dans un mélange de 20µL contenant 50ng d'ADNc, 5µM de chaque amorce spécifique sens et anti-sens (tableau 12), du tampon SYBR Green à 1X (Applied Biosystem) ou TaqMan à 2X, le tout ajusté à 20µL avec de l'eau pure. Pour chaque expérience, un témoin est réalisé ne contenant que de l'eau et le mélange réactionnel. La PCR consiste en 2min à 50°C, puis 3 min à 95°C, suivi de 40 cycles à 94°C 15 secondes, 60°C 1min. L'expression des transcrits est exprimée par rapport à celle du transcrit de la GAPDH, il s'agit d'une expression relative.

Sondes	Références	Fournisseurs
IL17-A	hs00174383_m1	Applied Biosystems
GAPDH	4310884E	Applied Biosystems

**Tableau 12. Sondes utilisées en PCRq**

#### **4. Dosage des cytokines**

Les surnageants de culture ont été collectés et les particules résiduelles ont été éliminées par centrifugation. Un kit commercial a permis de mesurer l'IL-17 (R&D Systems). L'ELISA a été réalisé selon les instructions fournies.

#### **5. Cytométrie en flux**

Lors des cocultures, nous avons utilisé les anticorps anti-CD4 couplé Pacific Blue (PB) (Beckman Coulter), anti-CD19 couplé APC Alexa Fluor 700 (APC-AF700) (Beckman Coulter) et anti-Chemokine (C-C motif) receptor 6 (CCR6) couplé PC7 (BD Biosciences). Les marqueurs isotypiques de ces anticorps ont servi de contrôles négatifs afin d'établir le seuil de détection.

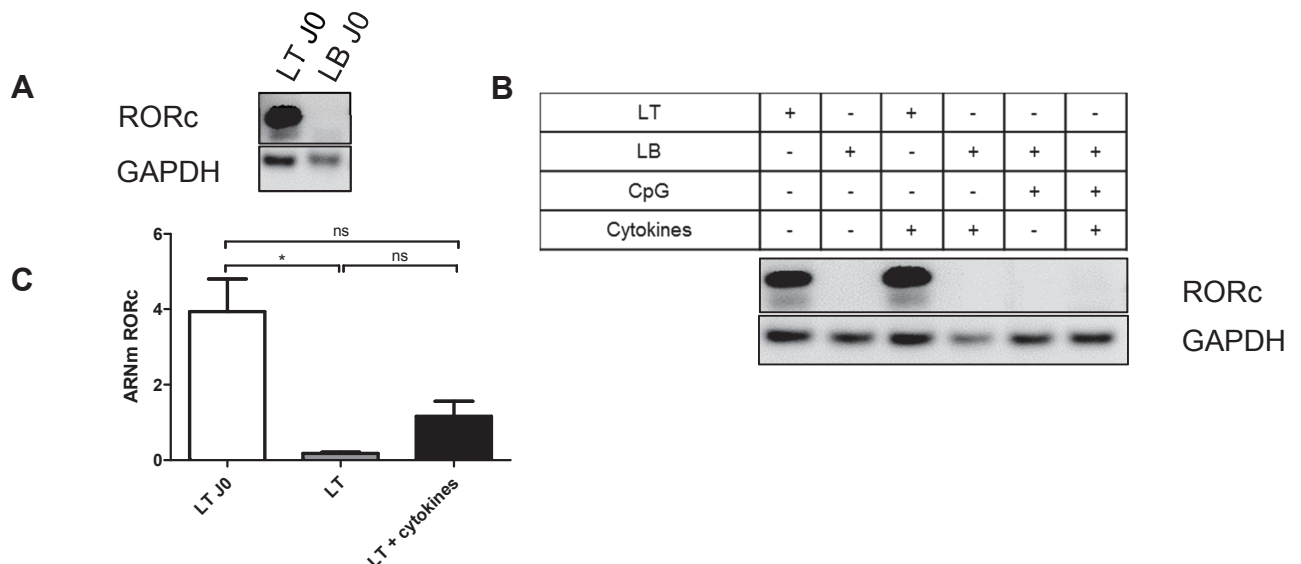
#### **6. Analyse statistiques**

Les données statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5, en utilisant soit le test non paramétrique Mann-Whitney, soit le t-test apparié, et exprimées par l'erreur standard de la moyenne. Lorsque  $p < 0,05$ , la différence est considérée comme significative.

### III. Résultats

#### 1. Mise en place d'un modèle *in vitro* de différenciation en Th17

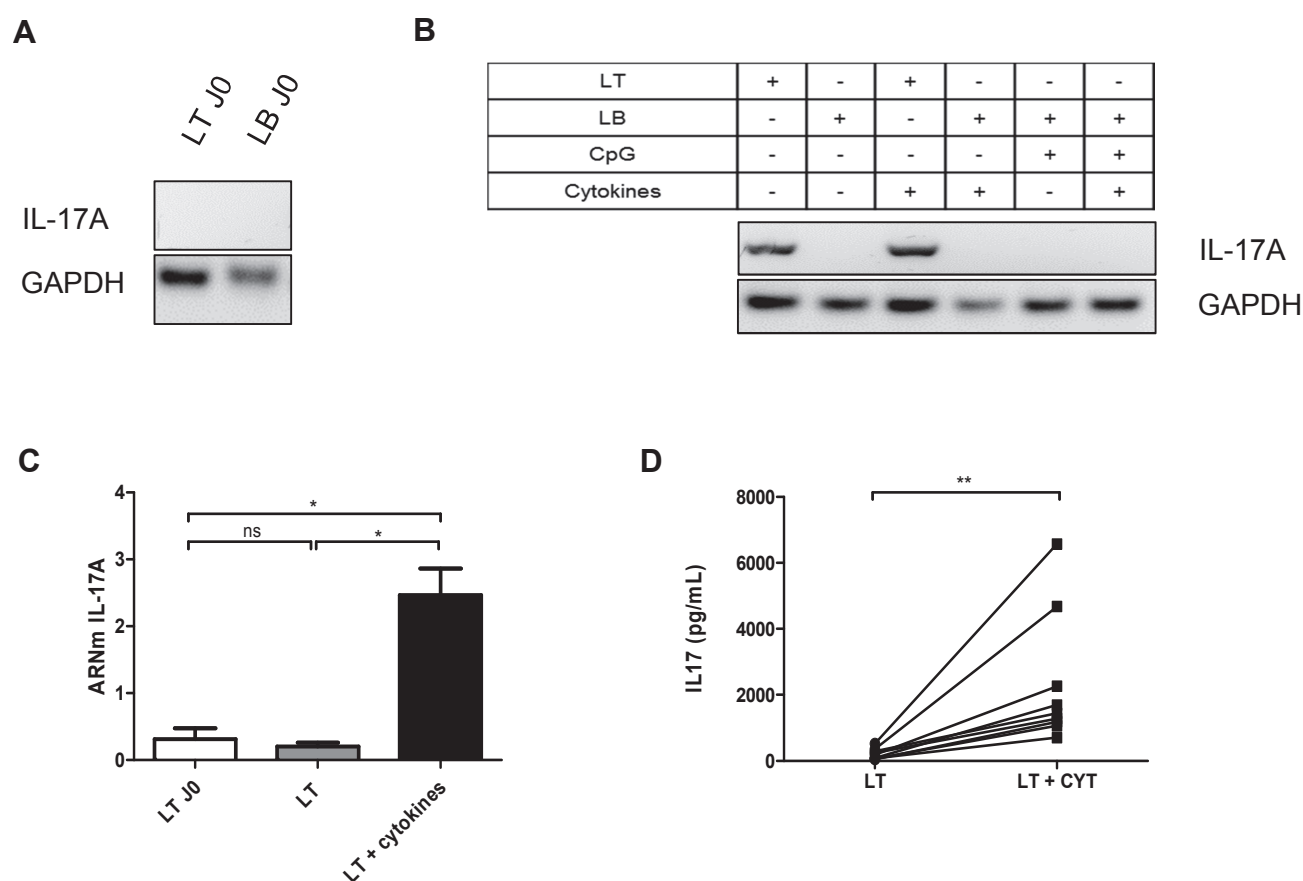
La première étape de ce projet a été de mettre au point un modèle *in vitro* de différenciation de LT en Th17. Nous avons donc choisi d'isoler et de purifier des LT CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> à partir de sang périphérique de volontaires sains. En effet, cette population de LT est reconnue pour être la principale source d'IL-17 parmi les LT dans la littérature (Liu and Rohowsky-Kochan 2008). Ces LT ont été mis en culture pendant 7 jours, stimulés par anti-CD3 et anti-CD28, en présence de 30µg/mL d'IL-6 et de 10µg/mL de TGFβ. Nous avons ensuite vérifié l'expression de l'IL-17 et de RORc afin de valider la différenciation en Th17. Par ailleurs, nous avons également vérifié l'expression de ces marqueurs par les LB que nous avons également isolés et purifiés à partir de sang périphérique. Ainsi, dans un premier temps, nous avons recherché l'expression du facteur de transcription RORc par RT-PCR et RT-PCRq. Nous observons une expression de RORc dans les LT à J0 ainsi que dans les LT stimulés ou non par les cytokines de polarisation (figure 33A et 33B). Les LT cultivés en condition de polarisation Th17 ont une tendance à exprimer davantage RORc que les LT cultivés sans cytokines ( $1,17 \pm 0,4$  vs  $0,2 \pm 0,03$ ,  $p=0,12$ ) (figure 33C). Par contre, les LB ne présentent aucune expression de RORc, à J0 ou à J7, qu'ils soient stimulés ou non par du CpG, en présence ou non de cytokines (figure 33A et 33B).



**Figure 33. Analyse de l'expression de RORc dans les TH17.**

Les LT et les LB sont récupérés après 7 jours de culture. Les LT ont été stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 avec ou sans cytokines (IL-6 + TGFβ). Les LB ont été stimulés ou non par CpG ODN. **(A)** : Expression de RORc par RT-PCR sur des cellules non stimulées à J0. **(B)** : Expression de RORc par RT-PCR à J7. **(C)** : Expression de RORc par RT-PCRq à J7. \* $p < 0,05$ ; ns = non significatif.

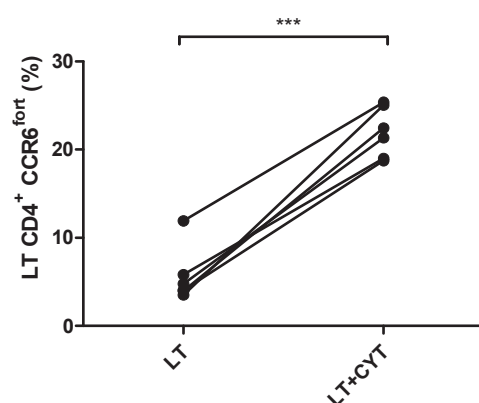
Afin de valider le modèle, nous avons ensuite cherché à mettre en évidence la présence d'IL-17 dans les LT. Nous observons une expression du messager de l'IL-17 à J7 dans les LT, qu'ils soient ou non en condition de polarisation Th17. Par contre, l'IL-17 n'est pas exprimée dans les LT à J0, ni dans les LB quelles que soit les conditions de culture (figure 34A et 34B). L'analyse par RT-PCR quantitative nous montre par ailleurs que le messager de l'IL-17 est faiblement présent dans les LT en absence de cytokines par rapport au LT avec cytokines ( $0,2 \pm 0,06$  vs  $2,5 \pm 0,4$ ,  $p=0,02$ ) (figure 34C). Le dosage par ELISA de l'IL-17 dans les surnageants de culture à J7 nous a ensuite permis d'observer un taux significativement plus élevé d'IL-17 dans les LT stimulés par l'IL-6 et le TGF $\beta$  par rapport aux LT sans cytokines ( $2321 \pm 660,5$  pg/mL vs  $209,4 \pm 54,0$  pg/mL,  $p=0,009$ ) (figure 34D).



**Figure 34. Analyse de l'expression de l'IL-17 dans les TH17.**

Les LT et les LB sont récupérés après 7 jours de culture. Les LT ont été stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 avec ou sans cytokines (IL-6 + TGF $\beta$ ). Les LB ont été stimulés ou non par CpG ODN. (A) : Expression de l'IL-17 par RT-PCR sur des cellules non stimulées à J0. (B) : Expression de l'IL-17 par RT-PCR à J7. (C) : Expression de l'IL-17 par RT-PCRq à J7. (D) : Dosage de l'IL-17 par ELISA dans les surnageants de culture à J7. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; ns = non significatif.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons décidé par la suite de visualiser la présence d'IL-17 par cytométrie. Hors, le matériel à disposition ne nous permet pas de détecter l'IL-17 par cette technique. En effet, après de nombreuses tentatives en utilisant divers anticorps et de multiples techniques de perméabilisation cellulaire, nous nous sommes trouvés dans l'impossibilité d'étudier l'expression de l'IL-17 par cytométrie. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à un marqueur de surface associé aux Th17, le CCR6 (Annunziato et al. 2007). Ce récepteur de chémokines est fortement exprimé sur les Th17, et joue un rôle dans leur recrutement au site de l'inflammation. Afin de valider l'efficacité de ce marqueur comme témoin de la différenciation en Th17, nous avons vérifié l'expression de CCR6 par les LT à J7 par cytométrie en flux. Il s'avère qu'en présence de cytokines, nous observons davantage de LT CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>fort</sup> (22,0±1,2% vs 5,6±1,3%,  $p<10^{-3}$ ) (figure 35).



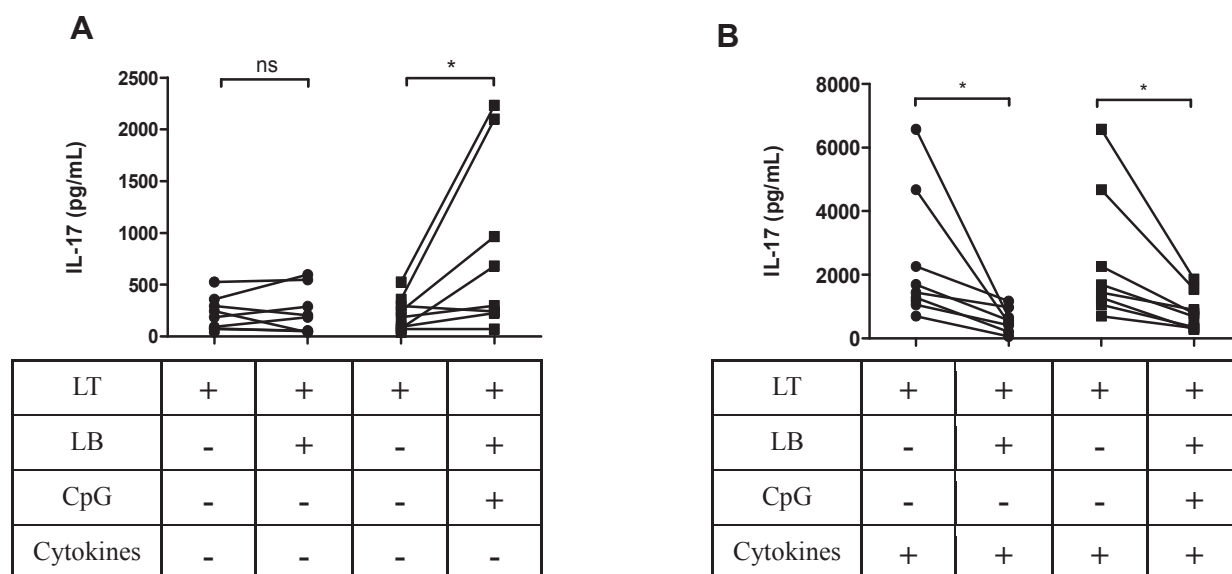
**Figure 35. Analyse de l'expression de CCR6 dans les Th17.**

Les LT sont récupérés après 7 jours de culture. Les LT ont été stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 avec ou sans cytokines (IL-6 + TGFβ). \*\*\* $P<0.001$ .

A ce stade, le modèle *in vitro* de différenciation en Th17 est validé. Après 7 jours de culture, nous avons en effet obtenu des Th17 caractérisés par l'expression conjointe du RORc, de l'IL-17 et de CCR6. Ces travaux préliminaires nous ont ainsi permis d'étudier l'influence du LB sur la différenciation en Th17.

## 2. Influence du LB sur la différenciation en Th17

Dans la suite de cette étude, nous avons ainsi cherché à savoir s'il existe une régulation de la différenciation en Th17 par le LB

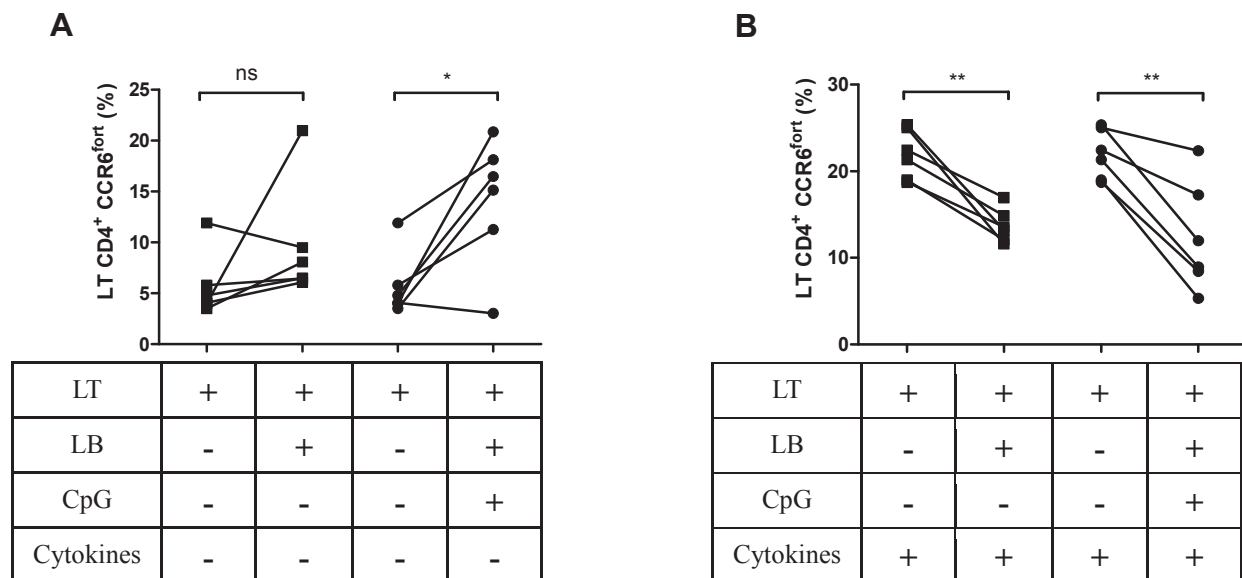


**Figure 36. Analyse de l'expression de l'IL-17 dans les Th17 en coculture.**

(A) et (B) : Les surnageants de culture sont récupérés après 7 jours de culture, puis dosés par ELISA. Les LT ont été stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 avec ou sans cytokines (IL-6 + TGF $\beta$ ), en présence ou non de LB +/- CpG. \*P<0.05

Ainsi, similairement aux premières expériences, nous avons cherché à mettre en évidence la sécrétion d'IL-17 et l'expression du marqueur CCR6 par les LT en présence de LB. Les résultats montrent que l'ajout de LB non stimulés en coculture avec des LT sans cytokines n'a pas d'effet sur la sécrétion d'IL-17 par les LT. Par contre lorsque les LB sont activés, nous remarquons une augmentation significative de la sécrétion d'IL-17 par rapport aux LT seuls ( $851 \pm 304,4$  pg/mL vs  $209,4 \pm 54,0$  pg/mL,  $p=0,04$ ) (figure 36A). Lorsque des LB sont ajoutés en présence de LT dans les conditions de polarisation Th17, les LB, activés ou non, inhibent significativement la production d'IL-17 par comparaison avec des LT seuls en présence de cytokines ( $2321 \pm 660,5$  pg/mL vs  $848,4 \pm 270,1$  pg/mL,  $p=0,02$  pour les LB activés et  $2321 \pm 660,5$  pg/mL vs  $568,2 \pm 130,5$  pg/mL,  $p=0,03$  pour les LB non activés) (figure 36B). Des résultats similaires sont observés par l'analyse du marqueur CCR6. En effet, l'ajout de LB activés augmente de façon significative le pourcentage de LT CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>fort</sup> en coculture en absence de cytokines ( $14,1 \pm 2,6\%$  vs  $5,7 \pm 1,3\%$ ,  $p=0,02$ ) (figure 37A). En condition de différenciation en Th17, les LB +/- CpG ont un rôle inhibiteur sur la population de LT CD4<sup>+</sup>

CCR6<sup>fort</sup> ( $12,4 \pm 2,6\%$  vs  $22,0 \pm 1,2\%$ ,  $p=0,003$  pour les LB activés et  $13,7 \pm 2,0\%$  vs  $22,0 \pm 1,2\%$ ,  $p=0,002$  pour les LB non activés) (figure 37B).



**Figure 37. Analyse de l'expression de CCR6 dans les Th17 en coculture.**

(A) et (B) : Les cellules sont récupérées après 7 jours de culture, marquées par un anticorps anti-CCR6 associé à un anti-CD4, puis analysées par cytométrie. Les LT ont été stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 avec ou sans cytokines (IL-6 + TGF $\beta$ ), en présence ou non de LB +/- CpG. \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  ; ns = non significatif.

#### IV. Conclusion

Nous avons réussi à mettre en place un modèle *in vitro* de différenciation en Th17 validé par une forte sécrétion d'IL-17 et l'expression du facteur de transcription RORc. Par contre, il nous est impossible de mettre en évidence la sécrétion d'IL-17 par cytométrie. C'est pourquoi nous avons trouvé un marqueur de surface qui semble nous permettre de discriminer la population Th17, le CCR6. Par la suite, l'étude sur la régulation de la différenciation Th17 par le LB montre deux résultats intéressants. En effet, en absence de cytokines de différenciation en Th17, les LB stimulés par du CpG induisent des LT CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>fort</sup> ainsi qu'une sécrétion d'IL-17 en coculture. Par ailleurs, dans ces conditions, si les LB ne sont pas activés, nous n'observons pas de variation d'expression d'IL-17 ni de RORc. Par contre, lorsque les cellules sont cultivées en présence des cytokines de différenciation en Th17, les LB inhibent la production d'IL-17 ainsi que le pourcentage de LT CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>fort</sup> en coculture. Dans ces conditions de polarisation en Th17, l'activation du LB ne semble ici jouer aucun rôle.

## **DISCUSSION**



Ce travail de thèse avait pour but de mieux comprendre l'implication du LB au cours du rejet humoral chronique (cABMR) et du rejet cellulaire aigu (ACR) en transplantation rénale. Ainsi, les travaux effectués au cours de cette thèse ont abouti à une meilleure compréhension du cABMR, dans lequel le LB joue un rôle prépondérant. Nous avons également mené en parallèle une étude dans le rejet cellulaire aigu. Ces deux approches nous ont permis de montrer que chaque type de rejet fonctionne différemment, avec une signature B qui lui est propre. Ceci pourrait alors ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la lutte contre le rejet d'allogreffe.

## **I. Le phénotype des LB dans le rejet**

### **1. Le rejet humoral chronique**

#### **1.1. La composition du groupe cABMR**

Notre travail est le premier à s'être intéressé au LB dans le rejet humoral chronique (cABMR). Les patients cABMR de notre étude sont caractérisés par une augmentation de la créatinémie et de la protéinurie, la présence de DSA ainsi qu'une glomérulopathie d'allogreffe associée à une capillarite péri-tubulaire. Certaines équipes qui travaillent sur la tolérance en transplantation ont élaboré un groupe de rejet chronique (CR) en tant que contrôle de leurs expériences. Cependant, la composition de leur groupe, basée sur une détérioration de la fonction rénale, est très hétérogène et implique de nombreuses complications rénales ne tenant compte que de la chronicité des épisodes de rejet (Pallier et al. 2010; Silva et al. 2012). Ainsi, si l'on se réfère à l'article de Pallier en 2010 (Pallier et al. 2010), le groupe rejet chronique comprend par exemple 5 patients sur 31 avec une glomérulopathie d'allogreffe, qui est un élément majeur dans la caractérisation du cABMR. Dans notre groupe d'étude, tous les patients présentent ce caractère pathologique. Par ailleurs, il est mentionné dans cet article que 18/31 patients présentent une suspicion de cABMR, et 8/31 patients possèdent une composante humorale dans leur rejet. Une autre étude menée par le groupe de Silva en 2012 repose également sur un groupe contrôle CR (Silva et al. 2012). Cependant, sur les 13 patients incriminés, il existe une très grande hétérogénéité des rejets dont 5 sont décrits comme rejet cellulaire chronique. En outre, la disparité phénotypique observée dans notre étude entre le rejet humoral et le rejet cellulaire suggère que des anomalies peuvent ne pas être détectées dans des groupes hétérogènes. En marge de ces études, ce travail de thèse représente ainsi une approche originale et unique sur un groupe cABMR homogène et finement caractérisé.

## 1.2. Les lymphocytes B du sang périphérique dans le cABMR

Dans un premier temps, l'étude des patients ayant développé un rejet humoral chronique nous a permis de mettre en évidence une distribution anormale des lymphocytes B dans le sang périphérique. Par rapport au compartiment B des patients stables, deux populations se distinguent : les LB Bm2 et Bm2' et les LB Bm5. Cependant, la classification Bm1-Bm5 est à prendre avec précaution lorsqu'il est question des cellules du sang périphérique. En effet, cette appellation fait référence à la description des sous-populations de LB matures dans les organes lymphoïdes secondaires. Nous l'avons ici transposé aux LB du sang afin de discriminer les différents états de maturation des sous-populations de LB périphériques (Pascual et al. 1994). En outre, cette transposition basée sur l'analyse du double marquage IgD/CD38 a été réalisée pour la première fois en 2001 dans le sang (Bohnhorst et al. 2001). L'équipe de Bohnhorst a en effet élaboré un schéma phénotypique permettant d'identifier les LB matures du sang périphérique. Ainsi, leurs travaux décrivent par analogie les Bm1 ( $CD38^- IgD^+$ ), les Bm2 ( $CD38^+ IgD^+$ ), les Bm2' ( $CD38^{++} IgD^+$ ), les eBm5 ( $CD38^+ IgD^-$ ) et les Bm5 ( $CD38^- IgD^-$ ) dans le sang de volontaires sains ainsi que de patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) et de Polyarthrite Rhumatoïde (PR). Cependant, il est impossible d'affirmer que ce sont fonctionnellement les mêmes cellules. D'autant plus que les LB Bm2', cellules fondatrices du centre germinatif ne sont pas retrouvées dans la circulation sanguine. Cette dénomination peut être un bon outil afin de discriminer les différentes catégories de LB dans le sang périphérique.

Nous avons ainsi pu observer une faible représentation des cellules Bm2 et Bm2' chez les patients cABMR, qui coïncide avec le niveau très bas de LB transitionnels  $CD24^{fort} CD38^{fort}$ . En effet, les LB Bm2 et Bm2' sont identifiés comme  $CD38^{+/fort}$  et peuvent ainsi se superposer phénotypiquement, du moins partiellement aux LB transitionnels  $CD24^{fort} CD38^{fort}$  (Sims et al. 2005). Ainsi, 5 à 10% des LB  $IgD^+ CD38^{fort}$  pourraient être des LB transitionnels caractérisés également par les marqueurs  $CD5^+$  et  $CD24^{fort}$ . Ces premières informations représentent un intérêt particulier car les LB transitionnels sont décrits comme une population régulatrice (Blair et al. 2010; Li et al. 2012). Dans ce contexte, il a d'ailleurs été suggéré suite à une transplantation d'organes, qu'une forte proportion de LB avec un phénotype transitionnel seraient associée à une meilleure tolérance. En effet, par comparaison avec des patients stables sous traitements immunosuppresseurs, plusieurs équipes ont décrit une augmentation des LB transitionnels  $CD24^{fort} CD38^{fort}$  chez des patients

opérationnellement tolérants (Newell et al. 2010; Sagoo et al. 2010). Par ailleurs, il a également été montré une diminution des LB transitionnels chez des patients qui développent un rejet chronique (Silva et al. 2012). Ces données viennent ainsi conforter nos résultats.

A l'inverse, le nombre important de LB Bm5 retrouvés dans le sang des patients cABMR est lui corrélé au fort pourcentage de LB mémoires post-switch  $\text{IgD}^- \text{CD27}^+$ . Il est intéressant de noter que les LB mémoires pré-switch  $\text{CD19}^+ \text{IgD}^+ \text{CD27}^+$  quant à eux ne présentent aucune anomalie de distribution. Il semble donc que seuls les LB au stade de différenciation terminale du LB mémoire soient altérés dans le cABMR. Cette observation est intéressante, car les LB Bm5 sont décrits comme des LB mémoires, et sont associés à une augmentation de la réponse des LT (Shlomchik and Weisel 2012) et au rejet d'allogreffe (Burns et al. 2009). Par ailleurs, il a été observé un faible pourcentage de LB mémoires chez des patients opérationnellement tolérants, ce qui suggère que cette population en excès dans le groupe cABMR pourrait être néfaste à la survie du greffon. Toutefois une autre étude affirme que les patients tolérants présentent une augmentation du compartiment B mémoire (Pallier et al. 2010), soulignant ainsi l'importance de cette population dans la tolérance. Les divergences sur l'implication des LB mémoires dans le rejet ou la tolérance peuvent en outre s'expliquer par les marqueurs utilisés pour identifier les LB mémoires. En effet, d'après nos résultats, le CD27 seul ne nous permet pas de détecter des différences significatives entre les différents groupes. Par contre, l'utilisation de la classification LB post-switch/pré-switch permet de déceler des anomalies non visibles dans le compartiment B mémoire global. D'autres équipes ont proposé l'existence de Bregs  $\text{IgD}^+ \text{CD27}^+$  sécréteurs d'IL-10 (Bouaziz et al. 2010; Iwata et al. 2011; Griffin and Rothstein 2012; Zha et al. 2012). Ces observations remettent en cause l'utilisation unique du marqueur CD27 pour discriminer des LB mémoires. Ainsi, le rôle des LB mémoires  $\text{CD27}^+$  reste à ce jour ambigu quant à leur implication dans le rejet ou dans la tolérance. Cependant, dans le rejet humoral chronique ici, la présence exacerbée de LB mémoires est corrélée à une forte expression de la molécule HLA-DR sur ces cellules. Cette observation est le reflet d'une forte capacité de présentation antigénique ainsi qu'à une importante production d'anticorps (Wu et al. 2013). Par ailleurs, l'abondance de LB mémoires dans le cABMR peut s'expliquer par la présence importante d'allo- et d'auto-antigènes chez les patients cABMR. Nous pouvons ainsi imaginer que les LB mémoires sont continuellement stimulés. En effet, après exposition à l'antigène, sous la dépendance des LT, les LB peuvent rapidement se différencier en LB mémoires (Ahmed and Gray 1996). Cette hypothèse pourrait

expliquer la formation d'un pool important de ces cellules dans le cABMR. Ces cellules auraient alors la possibilité d'entrer à nouveau dans la circulation sanguine.

### 1.3. Le ratio $Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5$

Dans le but de mettre en avant les différences majeures observées au sein des sous-populations de LB matures, nous avons mis en place une analyse par le ratio  $Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5$ . En effet, ce ratio a été utilisé pour la première fois au laboratoire lors de l'étude d'une cohorte de patients atteints de SGS (Binard et al. 2009). Il représente une signature typique pour cette pathologie, et a même été proposé comme critère diagnostic supplémentaire chez les patients SGS afin de les différencier des patients atteints de PR ou de LES. Ces patients SGS présentaient une augmentation des LB  $Bm2+Bm2'$  et une diminution des LB  $eBm5+Bm5$ . Leur ratio est supérieur ou égal à 5. Dans notre étude, les moyennes des ratios du groupe cABMR et du groupe stable sont de 2,1 et 5,7 respectivement. Ce ratio est d'ailleurs plus élevé dans le groupe stable par rapport à celui de volontaires sains (3,4). Ces observations nous laissent penser qu'un ratio trop bas chez un patient greffé pourrait être le témoin précoce de la survenue d'un rejet humoral chronique. Il serait intéressant de suivre l'évolution de ce ratio au cours du temps chez les patients transplantés afin de connaître sa valeur prédictive dans le cABMR. Il pourrait ainsi servir de critère diagnostic dans le cABMR à l'instar du SGS.

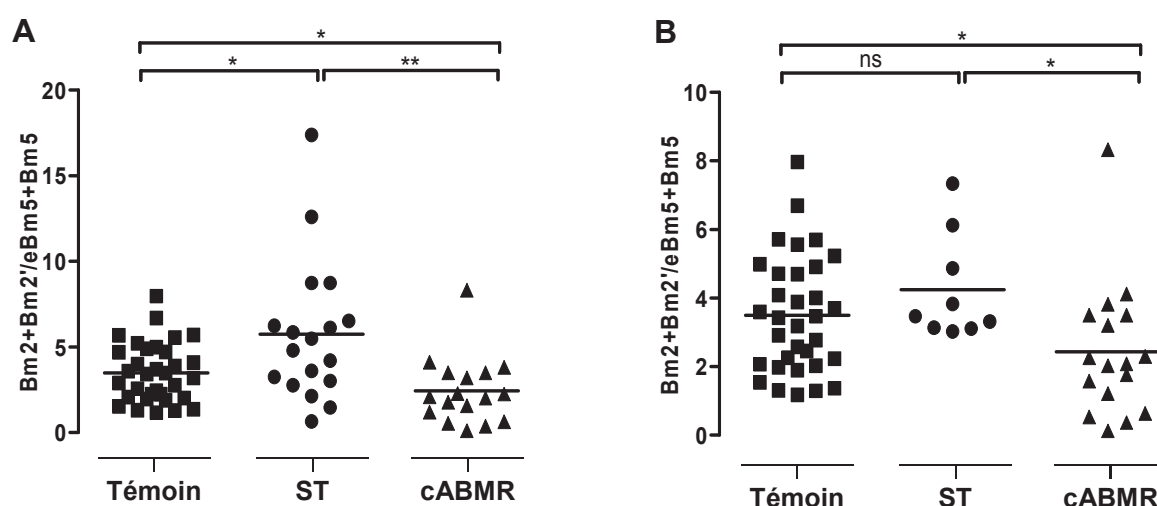
### 1.4. Les LT

Il est également intéressant de se pencher sur le phénotype des LT chez les patients cABMR. Ces patients présentent un fort pourcentage de LT effecteurs, donc activés, au détriment des LT naïfs. Ces résultats témoignent d'une capacité accrue des LT à engendrer une réponse immune et donc à conduire au rejet. Ces LT activés seraient également plus enclins à activer le pool de LB mémoires en excès dans le cABMR, amplifiant par la même occasion la composante humorale de ce rejet (Yoshida et al. 2010). Il faut aussi souligner que la majorité des LT présents dans le sang de ces patients sont des LT  $CD8^+$ . De ce fait, les LT  $CD4^+$  sont minoritaires, suggérant la présence d'un faible contingent de Tregs circulants chez ces patients cABMR et donc à un échappement aux mécanismes de régulation du système immunitaire. Ces résultats sont par ailleurs corrélés aux résultats d'une autre équipe qui a montré que la fréquence des Tregs circulants est diminuée lors du rejet, par rapport aux patients transplantés stables (Kim et al. 2009).

## 2. Les données cliniques

### 2.1. La composition du groupe stable

Au départ du projet, le groupe stable n'était constitué que de patients dans leur seconde année de transplantation, caractérisés par une créatinémie et une protéinurie normale, sans DSA, après leur biopsie systématique à un an. Nous nous sommes intéressés au rôle du délai post-transplantation sur le déséquilibre de distribution. Ainsi, nous avons analysé le ratio  $Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5$  dans deux sous-groupes de patients stables. L'un des sous-groupes est constitué de 9 patients stables greffés depuis 7,2 ans en moyenne et l'autre de 18 patients greffés depuis moins de 2 ans. Nous démontrons que pour chaque sous-groupe, ce ratio est significativement supérieur à celui du groupe cABMR ( $5,7 \pm 0,9$  vs  $2,1 \pm 0,4$  ;  $p < 0,002$  et  $4,2 \pm 0,5$  vs  $2,1 \pm 0,4$  ;  $p < 0,02$  respectivement) (figure 38). Ces données prouvent que le délai de transplantation n'affecte pas le compartiment B.



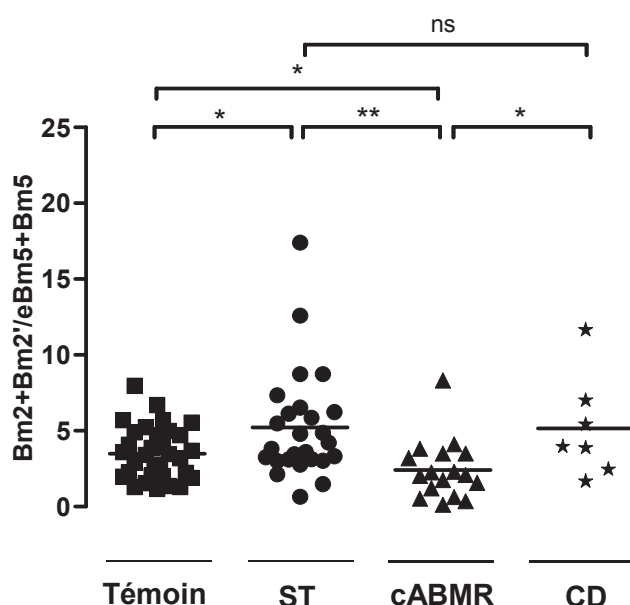
**Figure 38. Comparaison des ratios  $Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5$  de patients ST à court et long terme.**

Réalisée sur des patients cABMR, des volontaires sains et des patients ST à court terme greffés depuis moins de 2 ans (A) et ST à long terme greffés depuis 7,2 ans en moyenne (B). \* $p < 0,05$  ; \* $p < 0,01$  ; ns = non significatif.

### 2.2. La fonction rénale n'a pas d'impact sur la distribution des LB

Afin de démontrer que la différence de distribution des LB observée dans le rejet humoral chronique n'est pas due à une détérioration de la fonction rénale chez ces patients, nous avons étudié en parallèle un groupe de 7 patients n'ayant pas présenté d'épisode de rejet

antérieur et caractérisé seulement par une dysfonction du greffon (CD). En nous basant une nouvelle fois sur le ratio  $Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5$ , nous n'avons pas observé de différence entre le groupe ST et le groupe CD ( $5,2\pm0,7$  vs  $5,2\pm1,3$ ;  $p=ns$ ), contrairement aux patients cABMR qui présentent un ratio inférieur aux patients CD ( $2,4\pm0,5$  vs  $5,2\pm1,3$ ;  $p=0,02$ ) (figure 39). Ces résultats confirment que le déséquilibre de distribution dans le groupe cABMR n'est pas causé par une défaillance de la fonction rénale. Ainsi, les différences phénotypiques observées chez les patients cABMR ne sont pas imputables au délai post-greffe ou à la défaillance de la fonction rénale. Il existe probablement une conjonction de plusieurs phénomènes qui aboutit à un déséquilibre immunologique propre au cABMR.



**Figure 39. Analyse du ratio  $Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5$  de patients cABMR, de ST, de CD et de volontaires sains (Témoin).**  
 \* $P<0,05$  ; \*\* $P<0,01$  ; ns = non significatif.

### 2.3. Les traitements immunosuppresseurs n'influencent pas la distribution des LB

Afin de s'affranchir d'un effet dû aux traitements immunosuppresseurs administrés aux patients, nous avons comparé le ratio  $Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5$  entre les patients qui avaient le même traitement au sein des groupes. Ce ratio est diminué chez les 5 patients cABMR traités par un anti-IL-2R alors qu'il reste très haut chez les 23 patients stables traités par ce même anti-IL-2R ( $1,0\pm0,2$  vs  $5,1\pm0,7$  ;  $p=0,02$ ). Similairement, nous observons une diminution de ce ratio chez les 15 patients cABMR traités par stéroïdes comparés aux 15 patients stables traités de la même façon ( $2,4\pm0,5$  vs  $4,8\pm0,7$  ;  $p=0,01$ ). Ces résultats excluent

donc un effet des traitements immunosuppresseurs sur la distribution des LB. Pourtant certains traitements utilisés en transplantation peuvent avoir un impact sur les LB. Il a été montré par exemple *in vitro*, que l'acide mycophénolique (MPA) inhibe l'activation, la prolifération et la différenciation en plasmocytes des LB chez des sujets sains (Karnell et al. 2011). Par ailleurs, ce composé n'exerce pas un effet sur la totalité des LB, mais agit de manière sélective. En effet, il bloque l'expansion des LB naïfs et des LB mémoires. Cet immunosuppresseur est utilisé dans le traitement d'entretien chez la quasi-totalité des patients inclus dans notre étude.

### **3. Le rejet cellulaire aigu**

#### **3.1. Le phénotype des lymphocytes dans le sang périphérique**

L'étude du phénotype des LB du sang périphériques chez des patients ayant développé un rejet cellulaire aigu ne montre aucune différence de distribution des différentes populations de LB par rapport aux patients greffés stables. Seule une légère diminution des LB transitionnels  $CD19^+ CD24^{fort} CD38^{fort}$  est observée par rapport au groupe stable. Le compartiment T quant à lui présente des anomalies de distribution par rapport aux patients avec une fonction rénale stable. En effet, comme dans le cABMR, nous observons un faible pourcentage de LT naïfs. Mais contrairement au groupe cABMR caractérisé par une augmentation du pourcentage de LT effecteurs, nous avons ici une augmentation des LT mémoires dans le groupe ACR. Nos résultats sont par ailleurs en désaccord avec une étude réalisée en 2012 sur des patients ACR (van de Berg et al. 2012). En effet, il est décrit que les patients ACR ne présentent pas de différences significatives en pourcentage de LT  $CD4^+$  et de LT  $CD8^+$ , naïfs et effecteurs, par rapport à leur groupe de patients stables. Cependant ces différences avec notre étude peuvent s'expliquer par une raison. A l'inverse de notre étude sur cellules fraîchement isolées, leurs marquages ont été réalisés sur des cellules du sang périphérique congelées au préalable. La congélation cellulaire est une étape critique et il est possible que suite à la décongélation des cellules, certains marqueurs soient altérés (Costantini et al. 2003). Dans ce cas, les résultats obtenus pourraient être biaisés. Finalement, il n'existe pas de défaut de distribution des LB dans le sang périphérique des patients ACR, contrairement aux patients cABMR. Ces observations suggèrent que la physiopathologie de chaque rejet est unique.



### 3.2. Le phénotype des lymphocytes dans le greffon

L'absence d'anomalies de distribution des LB dans le sang périphérique des patients ACR nous amène à penser que le LB est peut être impliqué dans ce rejet mais de manière plus locale. Ceci s'explique notamment par l'existence d'une réaction inflammatoire très robuste au sein même du transplant, ce qui sous-entend le développement d'une réaction immunitaire importante au sein de l'organe greffé. Afin de le vérifier, nous nous sommes intéressés à des coupes de biopsies de patients ACR. Cette étude n'est cependant qu'à un stade préliminaire et les observations réalisées constituent seulement des hypothèses de travail au vu du faible contingent de biopsies étudiées. L'analyse de ces biopsies a été réalisée d'une part par immunohistochimie puis par immunofluorescence. Peu d'équipes se sont intéressées à l'analyse par microscopie des cellules B infiltrant le greffon lors du rejet cellulaire. En effet, les travaux déjà effectués chez les patients ACR se résument généralement à la mise en évidence d'un infiltrat de LB par un anti-CD20 par immunohistochimie (Martins et al. 2007; Mengel et al. 2007). Une équipe a cependant phénotypé le LB dans le rejet cellulaire mais leurs marquages par immunohistochimie sont réalisés indépendamment les uns des autres, rendant difficile et peu précise l'interprétation de possibles colocalisations de marqueurs (Zarkhin et al. 2008). Ainsi, il n'a jamais été effectué de marquages par immunofluorescence sur les biopsies de ces patients. C'est pourquoi l'originalité de notre travail a consisté à phénotyper les LB par immunofluorescence par microscopie confocale. L'intérêt majeur de cette technique est la capacité à pouvoir obtenir des images sur différents plans de coupes. Nous pouvons ainsi nous assurer que le marquage observé est bien spécifique d'un type cellulaire et n'est pas dû à une superposition de plusieurs cellules. De plus, nous pouvons réaliser un minimum de deux marquages différents par coupe afin d'observer des colocalisations. L'opportunité nous a été donnée d'avoir des coupes sériées de chaque patient inclus dans l'étude. Ainsi nous avons pu réaliser un grand nombre de marquages avec la possibilité de les confronter les uns avec les autres lorsque l'image a été obtenue dans une même zone de la biopsie.

#### 3.2.1. *L'infiltrat leucocytaire*

Les premières observations nous laissent penser qu'il existe un important infiltrat leucocytaire, plus particulièrement de LT et de LB au sein du greffon, ce qui confirmerait les observations déjà réalisées par une autre équipe (Sarwal et al. 2003). Il est cependant difficile de décrire quelles populations prédominent selon le grade du rejet étant donné que nous



n'avons aucune donnée quantitative à ce jour. Les résultats montrent cependant une répartition LT/LB très hétérogène selon les patients. Certains présentent un infiltrat diffus de LT et de LB sur toute la coupe tandis que d'autres au contraire se démarquent par la formation d'agrégats T/B très localisés. Des études réalisées dans le rejet chronique ont par ailleurs démontré que l'infiltration cellulaire intragreffe est planifiée selon une certaine organisation, en structures appelés TLT (Thaumat et al. 2010). Ces TLT contribuent à l'exacerbation de l'inflammation et sont constitués en particulier de LB et de LT formant des agrégats au sein du greffon. Ces données, bien que très précoces, nous laissent penser que de telles structures peuvent se former dans le rejet cellulaire aigu, en particulier dans les premiers stades du rejet où la présence d'agrégats semble plus importante.

### **3.2.2. Les LB infiltrés**

#### **– Les LB mémoires**

Par la suite, l'objectif a été d'essayer de caractériser plus précisément la population de LB présente au sein de l'organe greffé. Parallèlement au phénotypage réalisé dans le sang périphérique de ces patients, nous avons ainsi recherché la présence de LB mémoires CD27<sup>+</sup>. Une équipe a décrit la présence d'une population de LB mémoires dans le rejet cellulaire (Zarkhin et al. 2008). En effet, leurs travaux réalisés sur des sections consécutives d'un transplant ont montré l'existence d'un infiltrat de LB CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> chez des patients ACR dont le grade est compris entre IA et IIA. Les auteurs précisent toutefois que très peu LB CD27<sup>+</sup> sont observés et seuls 11/43 patients sont positifs pour le CD27. Le grade du rejet de ces 11 patients n'étant pas indiqué, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces patients présentent un rejet à un stade avancé, et qu'ainsi les LB mémoires arriveraient plus tardivement. En effet, en reprenant le raisonnement sur la formation de TLT, il a été décrit que ces structures peuvent démarrer le programme de néogénèse lymphoïde (Thaumat et al. 2010). Dans certains cas, la néogénèse est bloquée et conduit à l'accumulation de LB naïfs tandis que lorsque la néogénèse se poursuit, il se forme alors un centre germinatif ectopique, producteur de LB mémoires. Dans notre étude sur coupes rénales, nous n'avons pas réussi à détecter de LB mémoires par microscopie confocale. Peut-être sommes-nous confrontés à un problème technique ou alors le faible échantillon de biopsies à disposition ne nous permet pas de déceler ce marqueur qui semble présent chez une minorité de patients (Zarkhin et al. 2008). Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que les rejets cellulaires étudiés seraient de grades trop faibles pour avoir laissé le temps à la néogénèse lymphoïde de se poursuivre,

même si ces observations demandent à être confirmées sur un plus large panel de patients (figure 42).

Cependant, certaines cellules sont positives pour le marqueur CD27. Cette observation est intéressante car nous pouvons émettre l'hypothèse que les cellules CD27<sup>+</sup> observées sont des LT mémoires CD27<sup>+</sup> dans le transplant des patients ACR. Ce résultat peut être mis en relation avec la présence importante de LT mémoires dans le sang périphérique de ces patients et permet de formuler l'hypothèse qu'il existe un lien entre les LT mémoires intragreffes et ceux retrouvés en périphérie. Nous pouvons en effet imaginer que lors de l'activation du système immunitaire dans le greffon, face aux alloantigènes, un pool de LT mémoires se développe. Au fur et à mesure de la progression de l'inflammation, les dommages tissulaires seraient conséquents, dégradant toute la structure interne du transplant, ce qui laisserait échapper des LT mémoires du greffon vers la périphérie. Ainsi, les LT mémoires présents dans le sang périphérique seraient les mêmes que ceux retrouvés intragreffes. Nous pourrions le vérifier par un phénotypage plus précis de ces LT, par cytométrie notamment.

#### – Les LB activés

L'étape suivante a été ensuite d'analyser l'état d'activation des LB par le biais du CD38. Ce marqueur est une glycoprotéine de surface témoin de l'activation cellulaire dans de nombreuses cellules immunes comme les LT et les LB. La majeure partie des LB présents sur nos lames semblent exprimer le CD38. Cette observation est intéressante car il a déjà été montré sur des biopsies de rejet cellulaire aigu, la présence d'un nombre important de LB CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> (Hwang et al. 2010). Dans cette étude, cette population cellulaire est prédictive d'un rejet très agressif et s'avère critique pour la survie du greffon. Cependant, les auteurs n'ont pas été plus loin dans la description phénotypique des LB. C'est pourquoi, il nous a paru intéressant de vérifier l'expression de l'IgD afin de déterminer quelles sont les populations de LB matures présentes sur ces biopsies. Il semblerait que le nombre de LB IgD<sup>+</sup> augmente avec le grade du rejet. A l'instar de l'étude sur le compartiment B périphérique, nous pourrions par la suite analyser plus en détail cette population de LB dans les rejets de hauts grades. A ce stade, nous pouvons cependant émettre l'hypothèse qu'il existe deux types de LB au sein de nos biopsies, des LB CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> et des LB CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> dont le ratio diffère selon le grade du rejet. Ainsi, les LB CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> pourraient être assimilés à des cellules activées qui infiltrent rapidement le greffon de manière désorganisée au tout

début de rejet cellulaire. Les LB CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> retrouvés majoritairement dans les rejets de grades plus avancés seraient quant à eux des témoins de la mise en place de structures différenciées organisées, type centre germinatif. Cette théorie, qui demande à être confirmée, pourrait représenter un argument supplémentaire quant à la présence éventuelle de TLT au sein des greffons de patients ACR (figure 42). Il n'est pas exclu cependant que ces LB, phénotypiquement proche des Bm2, soient également des cellules régulatrices, type LB transitionnels, qui luttent ici contre l'inflammation. Il est ainsi difficile pour le moment d'analyser les sous-populations de LB sur le faible nombre de biopsies dont nous disposons. Les observations réalisées sur les différents marqueurs mériteraient en effet d'être effectuées sur une cohorte bien plus importante et nous pourrions également quantifier les LB de chaque sous-population pour affiner nos hypothèses de travail. Nous avons par ailleurs essayé d'approcher la fonction de ces LB infiltrés par la détection de cytokines pro- et anti-inflammatoires, ce qui aurait pu nous aiguiller quant au phénotype de ces LB, mais sans succès. Finalement, bien que ces observations soient très préliminaires, elles pourraient constituer une base pour la poursuite de ces travaux.

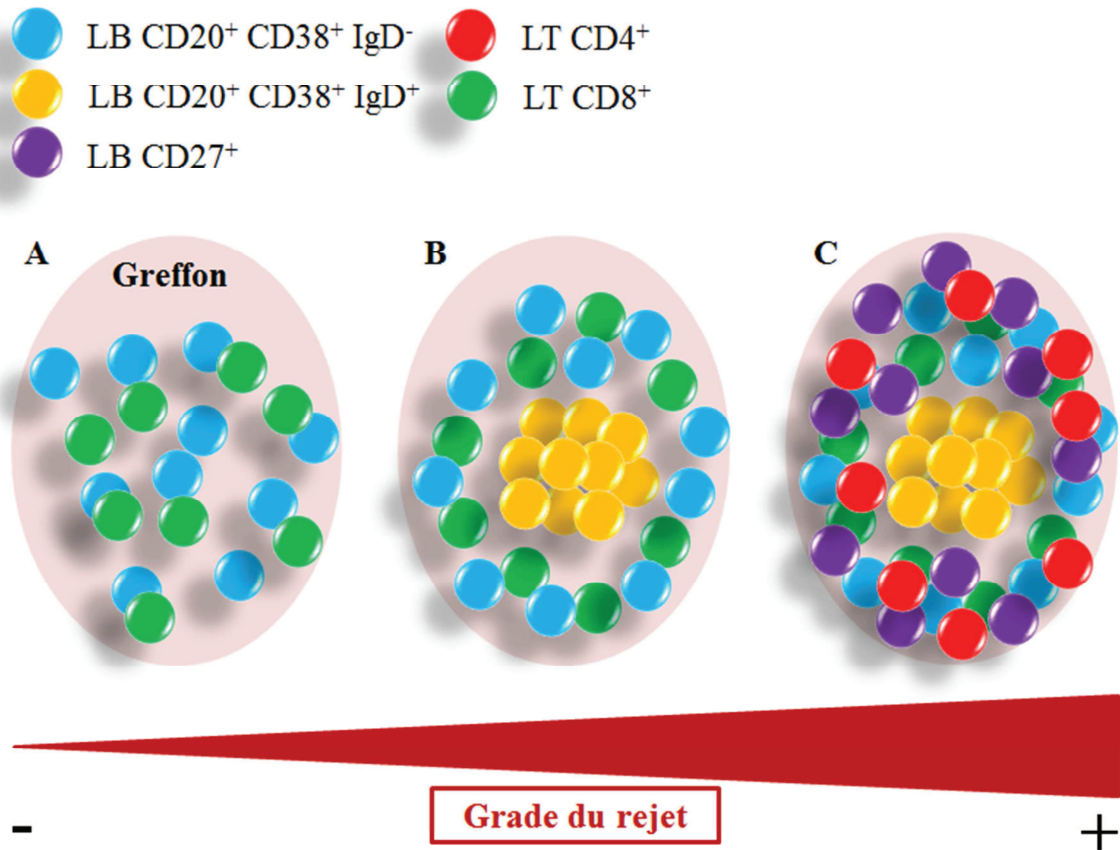
### ***3.2.3. La relation LT/LB***

Nous avons également cherché à étudier l'interaction entre LB et LT au sein des biopsies. En effet, le rejet cellulaire est caractérisé en tant que rejet à prédominance T. Ainsi, au vu du nombre important de LB au sein des biopsies des patients ACR, il s'avère primordial d'étudier la coopération LT/LB dans le greffon. Nous avons dans un premier temps réalisé des doubles marquages CD20/CD4 et CD20/CD8 par immunohistochimie afin de mettre en évidence, d'une part la présence de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, et d'autre part la proximité qui pourrait exister entre ces cellules et les LB. Ces doubles marquages ont à l'heure actuelle été réalisés chez un seul patient ACR et seuls des LT CD8<sup>+</sup> sont retrouvés au sein de cette biopsie, formant des agrégats avec les LB. Cette observation est notamment corrélée à l'observation faite par deux équipes où la majorité des LT retrouvés sur des biopsies rénales de rejet cellulaire aigu sont CD8<sup>+</sup> (Sarwal et al. 2003; Veronese et al. 2007). L'absence de marquage CD4 ici peut quant à lui s'expliquer par deux hypothèses. Soit le patient étudié n'a pas de LT CD4 infiltrés, soit nous sommes confrontés à un problème technique. Afin de vérifier dans un premier temps que l'anticorps utilisé pour détecter le CD4 est fonctionnel, nous l'avons testé en immunofluorescence sur deux biopsies de patients ACR. Nous avons mis en évidence la présence de LT CD4<sup>+</sup> chez un seul de ces deux patients. Ces observations confirment tout

d'abord que l'anticorps anti-CD4 utilisé est opérationnel et nous laisse penser que tous les patients ACR ne présentent pas de LT CD4<sup>+</sup> infiltrés au sein de leur biopsie. Ainsi, peut-être que l'infiltrat CD4 varie selon le grade du rejet. Par ailleurs, il a été observé un nombre important de LT CD4<sup>+</sup> activés au sein des TLT (Thaumat et al. 2010). Suivant l'hypothèse précédemment décrite, nous pouvons émettre la possibilité que les LT CD4<sup>+</sup> soient recrutés plus tardivement lors de la formation de TLT fonctionnels, expliquant de ce fait la variabilité du marquage CD4 chez les patients ACR (figure 40).

#### *3.2.4. Perspectives*

Ce projet initié depuis peu demande encore beaucoup de travail pour tirer de solides conclusions. Afin de confirmer les observations réalisées précédemment, il serait intéressant de pouvoir réaliser une élution à partir de biopsie fraîche de patients ACR. En effet, nous pourrions ainsi isoler les cellules leucocytaires de ces biopsies afin de les phénotyper par cytométrie en flux, comme nous l'avons fait dans le sang périphérique. Ce travail viendrait confirmer dans un premier temps les observations faites par microscopie. Nous pourrions également vérifier la nature des LT infiltrés afin d'observer si les LT du sang et les LT intragreffé sont les mêmes. L'obtention de cellules fraîchement isolés de biopsies de patients ACR pourrait également lever le doute quant à la présence ou non de CD4 chez tous les patients ACR. Par ailleurs, l'élution de biopsie permettrait d'affiner la caractérisation des cellules B infiltrés par la détection de marqueurs difficilement décelables en immunofluorescence. Enfin, l'analyse des cellules issues des biopsies par cytométrie en flux pourrait également nous permettre d'avoir des informations quantitatives sur les sous-populations de LB et de LT infiltrées. La quantification des lymphocytes serait ici un atout pour décortiquer la cinétique du rejet cellulaire aigu en fonction des différents grades, afin de voir qu'elles sont les premières cellules présentes au sein du greffon et dans quelle proportion. Ainsi, même si ce travail est à un stade de projet et se base principalement sur des hypothèses tirées d'observations, il semblerait intéressant d'entreprendre de nouvelles expériences afin de mener à bien cette étude.



**Figure 40. Représentation hypothétique de l'évolution de l'infiltrat cellulaire dans le greffon au cours du rejet cellulaire aigu.**

(A) Lors de l'initiation du rejet cellulaire, des LB CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> activés et des LT CD8<sup>+</sup> s'infiltrant de manière non organisée au sein du greffon. Cette étape représente le début de la dégradation de la fonction rénale. (B) Au cours du temps, l'infiltration ou la différenciation de LB CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> témoigne de la mise en place d'une organisation en TLT. L'apparition de ces structures participe à l'amplification de la réponse immune par la production locale d'alloanticorps notamment. (C) Un centre germinatif fonctionnel se développe et conduit à la génération de LB mémoires CD27<sup>+</sup> associés à l'apparition de LT CD4<sup>+</sup> au pourtour de cette structure.

## II. La régulation B dans le rejet

### 1. Dans le rejet humoral chronique

#### 1.1. Le modèle de coculture LT/LB

La description phénotypique du compartiment B périphérique nous a permis de mettre en évidence des différences majeures chez les patients ayant développé un rejet humoral chronique. Cependant la question a ensuite été de savoir si ces LB, bien que différents phénotypiquement, assurent un rôle fonctionnel normal. Afin de le vérifier, et tenant compte du fait de la grande difficulté à identifier des marqueurs de surface spécifiques des Bregs,

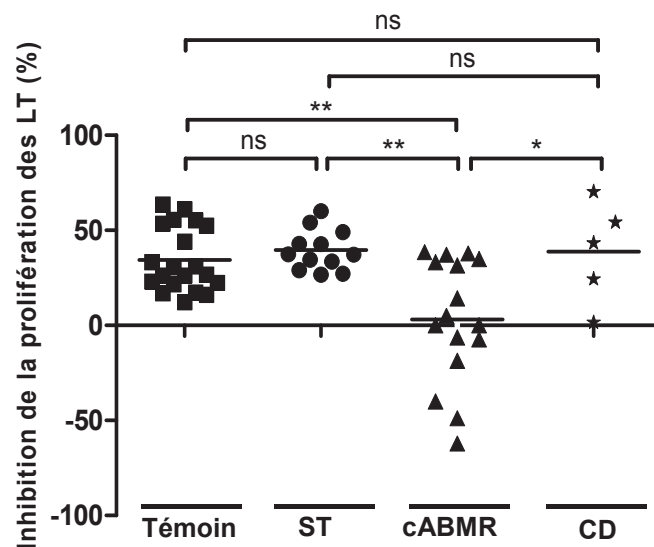
nous avons choisi d'analyser *in vitro* la capacité suppressive de l'ensemble des LB dans un modèle de coculture LT/LB. Ce modèle nous a permis d'étudier l'effet du LB sur la prolifération des LT. Les LT et les LB sont ajoutés à un ratio 1:1. Les LT sont activés par un anti-CD3 et un anti-CD28, tandis que les LB sont stimulés par du CpG.

La première difficulté rencontrée a été d'établir un modèle *in vitro* nécessitant peu de cellules. En effet, les patients qui ont développé un rejet humoral chronique sont d'une part lymphopéniques et d'autre part anémiques. Nous avons ainsi à disposition seulement 30mL de sang par patient, ce qui ne nous permettait pas de réaliser des expériences avec un nombre conséquent de cellules. Nous avons ainsi trouvé un compromis de 40000 LT +/- 40000 LB, assurant la faisabilité des expériences ainsi que leurs reproductibilités. Les LB inhibent ici la prolifération des LT à partir du 3<sup>ème</sup> jour de coculture avec un pic au jour 4. D'autres modèles *in vitro* d'étude du LB sur la prolifération des LT existent dans la littérature. Par exemple, au laboratoire, nous avons déjà élaboré un modèle où les LB sont pré-stimulés par des fibroblastes transfectés par le gène du CD40L humain en présence de CpG pendant 3 jours (Lemoine et al. 2011). Ces LB sont ensuite ajoutés en culture avec des LT totaux stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 pendant 5 jours. Dans ce contexte, les LB inhibent fortement la prolifération des LT dès le jour 4. L'équipe de Tretter quant à elle, pré-stimule des LB par du SAC, pendant 3 jours (Tretter et al. 2008). Après 4 jours de culture avec des LT CD4<sup>+</sup> stimulés par anti-CD3 et anti-CD28, les LB inhibent la prolifération des LT. Une autre équipe ajoute directement des LB stimulés par du CpG et un anti-Ig avec des LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> stimulés par anti-CD3 (Bouaziz et al. 2010). Les auteurs observent ici une forte inhibition de la prolifération des LT à J4, non visible lorsque les LB ne sont pas activés. Ces différentes études soulignent l'importance de l'activation du LB dans sa capacité à générer un effet régulateur. Dans notre modèle d'étude *in vitro*, la stimulation des LB par du CpG est suffisante pour observer une inhibition efficace de la prolifération des LT. De plus, notre modèle présente l'avantage de ne pas nécessiter de pré-activation des LB.

Une fois le modèle validé, nous avons étudié l'effet du LB de patients greffés sur la prolifération des LT en coculture autologue. Les LB de patients stables inhibent la prolifération de leurs propres LT, alors que les LB de patients cABMR en sont totalement incapables. Afin d'écarter une éventuelle dysfonction du LT chez le greffé, nous avons réalisé des cocultures hétérologues de LT de patients cABMR avec des LB de volontaires sains. Les LB des témoins inhibent ici la prolifération des LT issus de patients cABMR. Ces différents

éléments apportent la preuve que le défaut de régulation chez le patient cABMR est bien dû au LB.

De la même manière que pour le phénotype, nous avons également cherché à démontrer que le défaut de la fonction rénale des patients cABMR n'est pas responsable de l'anomalie fonctionnelle des LB. Ainsi, nous avons étudié la capacité des LB de patients CD à inhiber la prolifération des LT en coculture autologue. Les LB de patients CD, dont la distribution des LB dans le sang est similaire au patient stable, sont capables de régulation (figure 41).



**Figure 41. Les LB de patients CD inhibent la prolifération des LT en coculture autologue.**

Les LT de patients CD, ST, cABMR et de volontaires sains (Témoin) marqués au CFSE sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28, en présence ou non de LB stimulés par CpG. Les données sont représentées par l'expression en pourcentage de l'inhibition de la prolifération des LT par les LB à J4. \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  ; ns = non significatif.

## 1.2. Le potentiel régulateur des sous-populations de LB

Afin de vérifier si les anomalies phénotypiques observées dans le sang ont une répercussion sur la fonction des LB chez les patients cABMR, nous avons cherché à savoir si les différentes sous-populations de LB sont plus ou moins régulatrices. Nous avons ainsi choisi de trier ces populations de LB chez des volontaires sains. Cette approche est innovante. En effet, la plupart des travaux réalisés sur l'étude de la prolifération des LT en présence de LB, concernent les LB totaux ou les LB transitionnels. Ainsi, l'originalité de ce travail résulte en la mise en évidence de la capacité à inhiber la prolifération des LT pour chaque sous-population. Les LB Bm2/Bm2', les LB IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> et les LB transitionnels CD24<sup>fort</sup> CD38<sup>fort</sup>



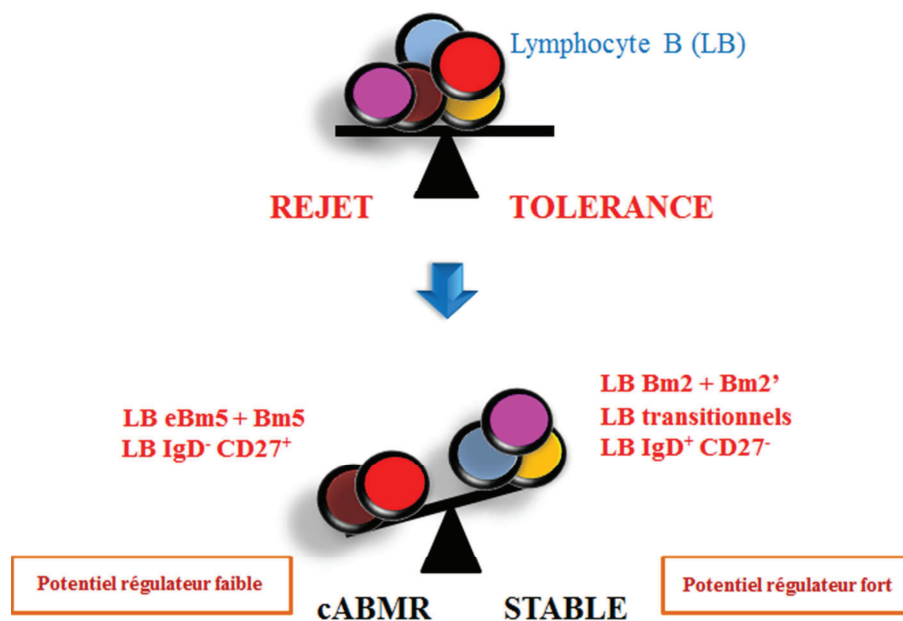
inhibent plus fortement la prolifération que les LB eBm5/Bm5, les LB IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> et les LB CD24<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> respectivement. Ces données se révèlent être majeures dans la compréhension du défaut de régulation existant chez les patients cABMR. En effet, nous pouvons noter que les populations de LB inhibant fortement la prolifération des LT sont celles qui sont minoritaires dans le rejet humoral chronique. A l'inverse, celles qui sont faiblement régulatrices sont celles retrouvées en excès chez ces patients. Il semble donc exister un lien entre le défaut de distribution des LB et le défaut fonctionnel observé chez les patients cABMR. Ceci explique par la même occasion la capacité du LB des patients ayant développé un rejet cellulaire aigu à inhiber la prolifération des LT, patients chez lesquels nous avons montré une distribution des LB similaire à celle des patients stables. Ces résultats suggèrent notamment que les LB activés Bm2/Bm2', caractérisés par une forte capacité à inhiber la prolifération des LT, représentent le compartiment B qui contient les Bregs. Il faut toutefois prendre en considération l'état d'activation des LB en culture. En effet, nous avons en parallèle réalisé des cocultures avec chaque sous-population de LB en absence de CpG. Nous ne détectons plus d'inhibition de la prolifération des LT avec les LB eBm5/Bm5, les LB IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> et les LB CD24<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>. Par contre, la fonction inhibitrice des LB Bm2/Bm2', des LB IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> et des LB transitionnels est maintenue. Ces résultats suggèrent que certaines sous-populations de LB semblent être régulatrices *de novo* tandis que d'autres nécessitent un signal activateur afin d'engendrer un effet régulateur. Le microenvironnement semble donc être un élément prépondérant dans la capacité du LB à devenir régulateur.

Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes seulement intéressés à l'inhibition de la prolifération des LT. Il serait intéressant de comprendre pourquoi chaque sous-population de LB a une capacité régulatrice différente. Ainsi, nous avons montré que les cultures cellulaires réalisées avec des LB Bm2/Bm2' et des LB transitionnels induisent davantage de LT CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> que les autres sous-populations. Cette observation confirme le fort potentiel régulateur de ces populations, et explique leur capacité à inhiber efficacement la prolifération des LT. Par ailleurs, il serait également intéressant de mesurer les sécrétions de cytokines, comme l'IL-10 et le TGFβ dans le surnageant de chaque coculture effectuée avec des populations de LB différentes.

Finalement, le déséquilibre de distribution des sous-populations de LB pourrait expliquer le défaut de régulation chez le patient cABMR (figure 42). De plus, ce déséquilibre persiste après activation des LB en coculture, suggérant qu'il n'existe pas de mécanismes de



correction au sein du système immunitaire pour ces patients. La distribution des sous-populations de LB semble ainsi refléter la capacité des LB à mettre en place une régulation efficace en coculture. Une question persiste cependant : le défaut de distribution chez les patients cABMR est-il une conséquence ou une cause du rejet ? Nous pourrions en effet imaginer que les anomalies phénotypiques observées dans le sang de ces patients soient une conséquence du cABMR, dû à une suractivation de certaines populations de LB ou encore à un défaut fonctionnel dans les organes lymphoïdes secondaires. Cependant l'hypothèse que ce déséquilibre de distribution soit un élément déclencheur du rejet reste la plus probable. Peut-être existe-t-il un défaut intrinsèque du LB au moment de la greffe, ou encore un défaut de l'hématopoïèse chez ces patients. La présence d'alloantigènes pourrait également contribuer à conduire à l'excès de certaines populations cellulaires comme les LB mémoires. A l'heure actuelle, toutes ces interrogations n'ont pas de réponse, pourtant la balance Bregs/B effecteurs est altérée à un moment donné dans le cABMR.



**Figure 42. Le déséquilibre de distribution des lymphocytes B dans le cABMR.**

Suite à la transplantation rénale, il existe une balance entre rejet et tolérance faisant intervenir les LT et les LB. Par comparaison avec des patients stables, les patients cABMR présentent une diminution des LB Bm2+Bm2', des LB transitionnels et des LB IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> et une augmentation des LB eBm5+Bm5 et des LB IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>. Ce déséquilibre des populations de LB est corrélé à un défaut des fonctions régulatrices chez ces patients cABMR.

### 1.3. Le défaut intrinsèque des LB

#### 1.3.1. L'IL-10 et le TGF $\beta$

Après avoir montré dans un premier temps l'impact que pouvait avoir la distribution des LB sur la régulation dans le groupe cABMR, nous nous sommes ensuite intéressés à l'aspect qualitatif du LB des patients cABMR. Au laboratoire, des travaux ont montré que le LB a la capacité d'inhiber la différenciation en Th1 après une stimulation par du CpG couplée à l'interaction CD40/CD40L (Lemoine et al. 2011). Nous avons également mis en évidence une inhibition de la sécrétion de ces cytokines dans les cocultures cellulaires issues de patients stables. Chez les patients cABMR, ces cytokines restent très fortement exprimées en présence de LB. Il existe donc un défaut d'inhibition de la polarisation Th1 dans le groupe cABMR. Par ailleurs, il a déjà été montré au laboratoire que ce mécanisme se fait par le biais de la sécrétion d'IL-10 du LB (Lemoine et al. 2011). Nous avons validé cette observation par l'utilisation d'un anticorps bloquant l'IL-10 en coculture, chez des volontaires sains, ce qui a permis de restaurer la sécrétion en IFN $\gamma$ . Au vu de l'importance de l'IL-10 ici, nous nous sommes demandé par la suite si cette cytokine peut également être responsable de l'inhibition de la prolifération des LT. Hors, la neutralisation de l'IL-10 en coculture n'a aucun effet sur la prolifération des LT, conformément aux résultats déjà obtenus au laboratoire (Lemoine et al. 2011). Nous ne pouvons donc pas incriminer l'IL-10 dans ce phénomène.

C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers une autre cytokine immunosuppressive, le TGF $\beta$ . Cette cytokine tient un rôle important en transplantation, notamment par son implication dans l'établissement de la tolérance que ce soit dans les modèles murins ou chez l'Homme (Regateiro et al. 2011). Le blocage du TGF $\beta$  en coculture entraîne ici un rétablissement partiel de la prolifération et n'a aucun effet sur la sécrétion d'IFN $\gamma$ . Ces résultats sont originaux car les Bregs sont principalement décrits par leur capacité à sécréter de l'IL-10. Il s'avère ici que le TGF $\beta$  semble aussi important que l'IL-10 dans la régulation B, même si ces deux cytokines ont des effets différents. Cependant, l'étude du TGF $\beta$  est compliquée. En effet, il est décrit dans la littérature que le TGF $\beta$  peut également être retrouvé sous forme membranaire, en particulier sur les Tregs (Gandhi et al. 2010). Il est alors fixé à une protéine adaptatrice à la surface de la cellule, le LAP. Les Tregs peuvent ainsi induire leur effet régulateur directement par contact cellule-cellule *via* ce mécanisme. Il est important de noter que ce TGF $\beta$  membranaire ne peut pas être détecté par un anticorps anti-TGF $\beta$  conventionnel mais peut cependant être évalué par l'analyse de l'expression du LAP.

L'existence de ce TGF $\beta$  membranaire nous amène donc à nous demander si l'utilisation d'un anticorps bloquant le TGF $\beta$  est réellement efficace à 100%. En effet, il est probable que nous bloquons seulement le TGF $\beta$  sécrété et qu'il persiste encore l'effet induit par le TGF $\beta$  membranaire. C'est pourquoi nous avons mesuré l'expression de ce TGF $\beta$  membranaire par l'étude du LAP en cytométrie, mais aucunes informations pertinentes n'ont été observées.

### *1.3.2. L'indoleamine 2,3-dioxygénase*

Si l'on se réfère à la littérature, le TGF $\beta$  est une cytokine essentielle dans le fonctionnement des cellules dendritiques (DC). En effet, la stimulation de DC par du TGF $\beta$  mène à l'activation d'une enzyme immunosuppressive, l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Pallotta et al. 2011). Cette enzyme étudiée principalement dans le cancer participe à l'immunité anti-tumorale, et peut être activée soit par l'IFN $\gamma$  soit par le TGF $\beta$  dans les DC (Pallotta et al. 2011). Lors d'une forte inflammation, l'IFN $\gamma$  présent en quantité abondante dans le microenvironnement stimule l'activité enzymatique d'IDO. Cette voie se met rapidement en place et entraîne le catabolisme du tryptophane dans le milieu extracellulaire. Par la privation de cet acide aminé, essentiel pour la prolifération et la survie des LT, et par l'accumulation des produits de dégradations obtenus, l'activation d'IDO conduit à la génération de Tregs. Cependant ce mécanisme joue un rôle à court terme. Le deuxième mode d'activation d'IDO se fait par le biais d'une stimulation par le TGF $\beta$ . Comme pour l'IFN $\gamma$ , le TGF $\beta$  active la voie catalytique d'IDO mais à plus faible échelle. En outre, le TGF $\beta$  entraîne également l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire passant par IDO. Ce signal contribue à la mise en place d'une boucle d'amplification permettant le maintien d'une expression élevée d'IDO, et ainsi au maintien du phénotype régulateur des DC. Ce mécanisme permet ainsi de prolonger l'effet d'IDO sur du long terme et participe de ce fait à l'établissement de la tolérance. De plus, il est montré dans cet article que la voie TGF $\beta$ /IDO serait davantage susceptible à induire des Tregs CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> que l'axe IFN $\gamma$ /IDO. Ces deux voies ne sont sans doute pas exclusives, et pourraient se superposer l'une à l'autre. Ces observations ont été réalisées dans des DC au phénotype plutôt immature. Les Bregs étant associés aux cellules B transitionnelles, qui représentent elles-mêmes une forme d'immaturité, nous avons supposé qu'IDO puisse être exprimée par les Bregs. Bien que son expression soit démontrée dans les LB murins, certains auteurs évoquent sa présence dans les LB humains (Johnson et al. 2010; Godin-Ethier et al. 2011). Cependant, l'équipe de Godin-Ethier montre qu'IDO est exprimée dans des LB stimulés par CD40L + IFN $\gamma$  +/- CpG mais cette enzyme

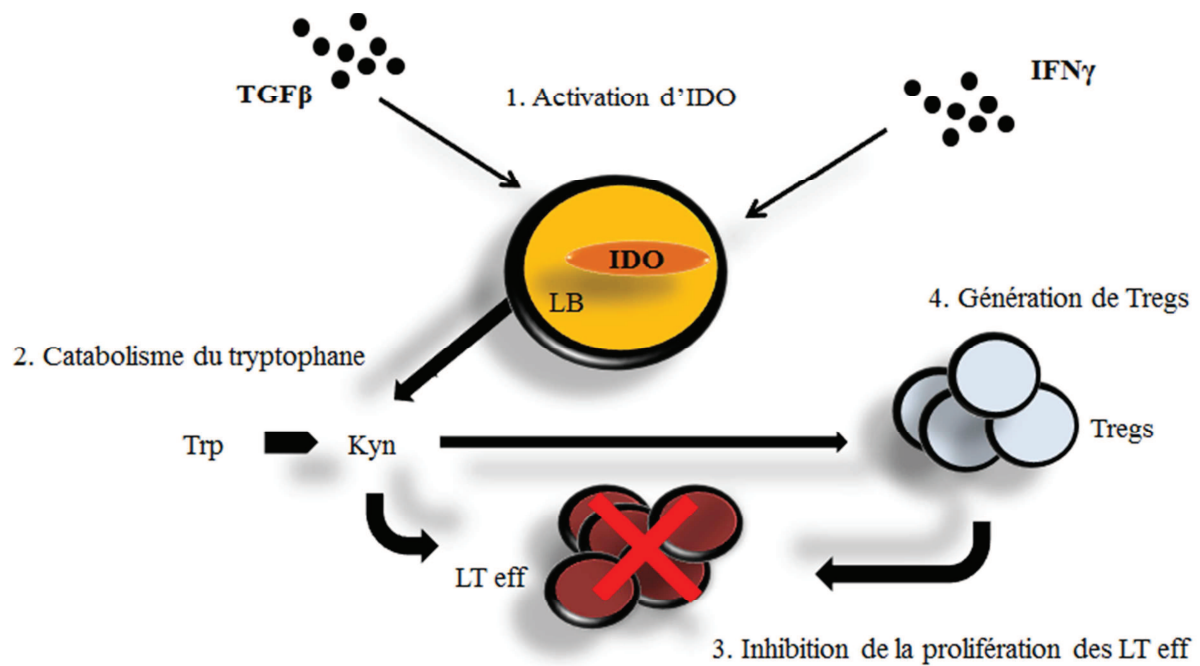
n'est ici pas fonctionnelle (Godin-Ethier et al. 2011). En effet, le tryptophane du milieu extracellulaire n'est pas dégradé suite à l'expression de cette enzyme par les LB.

Dans notre étude, IDO est exprimée, que ce soit par les LB de volontaires sains, de patients stables ou encore de patients ayant développé un rejet humoral chronique. Cependant, le pourcentage de LB IDO<sup>+</sup> détectés au sein des cocultures des patients cABMR est significativement plus faible que celui observé chez les patients stables. Nous sommes ainsi une des premières équipes à démontrer une expression d'IDO par le LB. Cette observation est une vraie découverte et représente un intérêt majeur pour la compréhension des mécanismes de régulation des Bregs, dont nous pouvons supposer que le mode d'action se rapproche de celui des DC.

Une fois cette enzyme mise en évidence, il a fallu ensuite vérifier son implication dans l'inhibition de la prolifération des LT dans notre modèle. Pour ce faire nous avons neutralisé IDO dans notre modèle de coculture par l'utilisation d'un inhibiteur enzymatique, le 1 méthyl-tryptophane (1-MT). Cet inhibiteur rétablit partiellement la prolifération des LT, à l'instar de l'anti-TGFβ bloquant. IDO exprimée par les LB semble donc mettre en place ici son activité catalytique contrairement aux observations de l'équipe de Godin-Ethier (Godin-Ethier et al. 2011). Cependant, dans leurs expériences, l'activité catalytique d'IDO est évaluée après 24h de culture. Hors nous évaluons l'effet de cette enzyme sur la prolifération des LT au jour 4 de coculture. Le moment auquel est réalisée l'analyse pourrait expliquer le fait que nous observons une enzyme fonctionnelle. En effet, nous pouvons supposer que les conséquences de l'activation d'IDO sont visibles dans un laps de temps supérieur à 24h. Par ailleurs, lorsque le 1-MT est combiné à l'anti-TGFβ bloquant, l'effet est potentialisé et l'inhibition de la prolifération des LT est quasi nulle. IDO joue donc un rôle dans la régulation dans notre modèle, rôle également dépendant du TGFβ. IDO étant induit par le TGFβ, il est intrigant de constater que seule la combinaison du 1-MT et du TGFβ bloquant restaure complètement la prolifération des LT. En effet, l'ajout en culture de l'un ou l'autre séparément devrait suffire à rétablir la prolifération des LT. Ceci peut s'expliquer par deux hypothèses. Premièrement, le 1-MT est un inhibiteur enzymatique et ne cible donc que l'activité catalytique de l'enzyme IDO. Hors, comme nous l'avons précédemment évoqué, IDO peut également jouer un rôle indépendamment de son activité catalytique (Pallotta et al. 2011). Cette observation constitue un premier élément de réponse quant au rétablissement partiel de la prolifération des LT par l'utilisation du 1-MT. D'autre part, en inhibant le TGFβ, nous

devrions inhiber IDO et donc logiquement abrogé complètement l'inhibition de la prolifération des LT. Mais l'effet n'est que partiel, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'IDO puisse également être activée suite à une stimulation par l'IFN $\gamma$  (Croitoru-Lamoury et al. 2011). Par ailleurs, nous observons un fort niveau d'IFN $\gamma$  en coculture, permettant d'asseoir davantage cette hypothèse. Ces différentes explications permettraient ainsi de comprendre que seule l'utilisation conjointe du 1 MT et de l'anti-TGF $\beta$  bloquant restaure entièrement la prolifération des LT.

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence l'induction de Tregs par les LB en coculture. Chez l'Homme, les LB peuvent en effet induire et expandre des Tregs *in vitro* (Tu et al. 2008; Lemoine et al. 2011). Nous observons une augmentation des Tregs naturels CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> et des Tregs induits CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> (Tr1) ou TGF $\beta$ <sup>+</sup> (Th3) lorsque les LT sont en présence de LB. Cette observation est valable également pour les patients avec une fonction rénale stable. Par contre, chez les patients cABMR, les LB sont incapables d'induire des Tregs, et inhibent même la production de Th3. L'absence de ces populations au sein des cocultures chez les patients cABMR constitue en partie une réponse au défaut d'inhibition de la prolifération des LT observé dans notre modèle. Ces résultats concordent avec ce qui est déjà décrit dans la littérature. En effet, il a déjà été observé une diminution de LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> exprimant Foxp3 chez des patients ayant développé un rejet chronique par comparaison avec ceux possédant une fonction rénale stable (Louis et al. 2006). Afin d'asseoir le lien entre l'axe régulateur TGF $\beta$ /IDO et Tregs, nous avons également vérifié l'évolution des LT CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en coculture, sous l'effet du 1-MT, du TGF $\beta$  bloquant ou de la combinaison des deux. Nous observons une diminution importante du pourcentage de LT CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> sous l'effet de ces différents inhibiteurs, qui est davantage visible lorsqu'ils sont couplés. Ces différences peuvent s'expliquer par les mêmes raisons que celles décrites précédemment au sujet de l'inhibition de la prolifération des LT. Nous avons ainsi démontré que l'inhibition de la prolifération des LT dans notre modèle semble bien dépendante d'un axe régulateur TGF $\beta$ /IDO conduisant à la génération de Tregs (figure 43). Tous ces éléments cumulés pourraient expliquer le défaut de régulation chez les patients cABMR. A l'instar des DC, la régulation par IDO dans le LB semble ainsi jouer un rôle majeur. Cette voie n'a jamais été démontrée auparavant dans le LB et ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes d'actions des Bregs.



**Figure 43. Le rôle d'IDO dans l'inhibition de la prolifération des LT.**

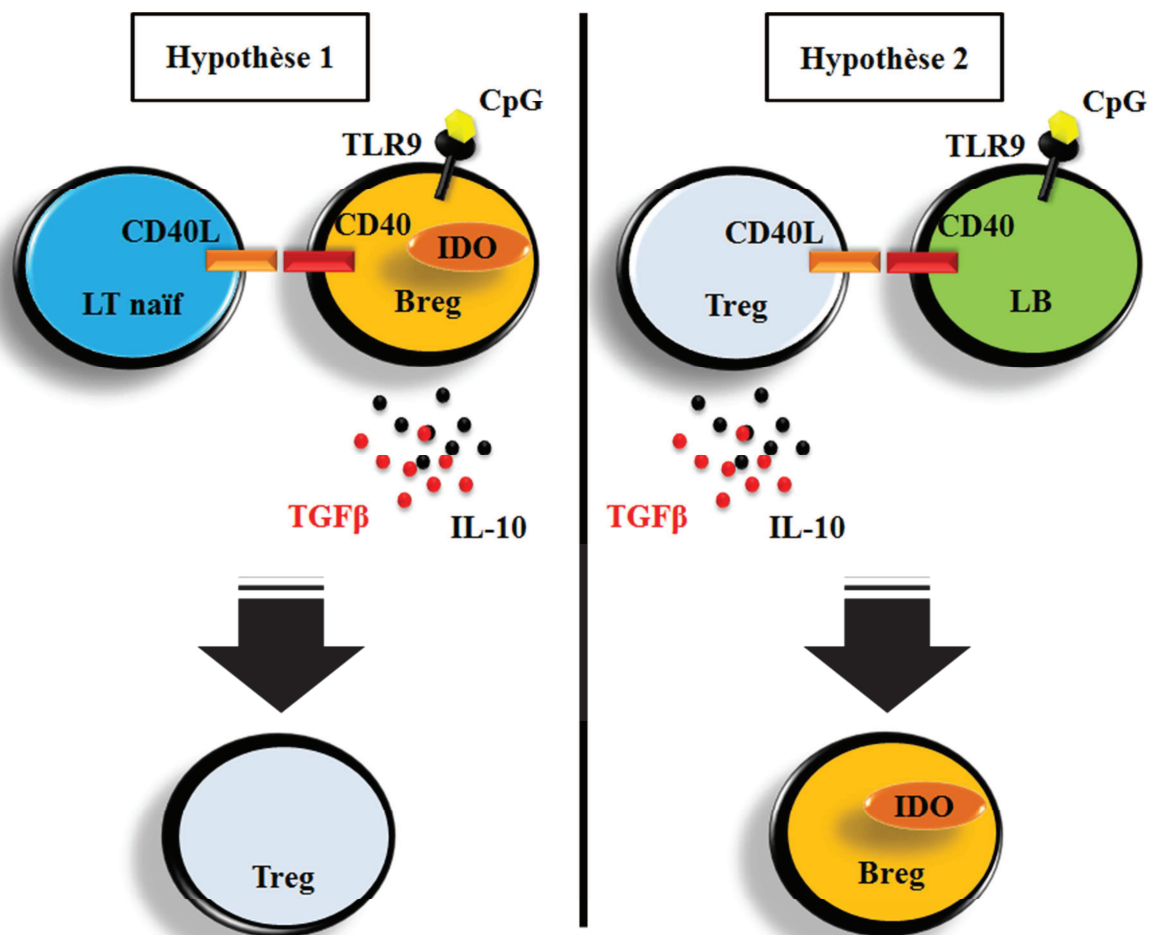
1. L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) est activée suite à une stimulation par du TGFβ ou de l'IFNγ. 2. Cette activation entraîne le catabolisme du tryptophane (Trp) en produits de dégradation, les kynurénines (Kyn). 3 et 4. Ces derniers peuvent soit directement inhiber la prolifération des LT effecteurs (LT eff), soit induire la génération de LT régulateurs (Tregs).

Il s'est également avéré intéressant de vérifier l'expression de l'IL-10 et du TGFβ par le LB. Nous retrouvons un pourcentage plus faible de LB IL10<sup>+</sup> et de LB TGFβ<sup>+</sup> dans les cocultures de patients cABMR. Le groupe cABMR présente donc un déficit dans toutes les cellules régulatrices, notamment reflété par une défaillance dans la sécrétion d'IL-10 et de TGFβ, que ce soit par le LT ou par le LB. Le faible taux sécrété de ces cytokines a deux principales conséquences. D'une part, le manque d'IL-10 engendre une incapacité du LB à inhiber la réponse Th1. D'autre part, le déficit en TGFβ ne permet pas au LB d'inhiber la prolifération des LT.

Nous démontrons finalement qu'en plus du déficit en cellules B régulatrices présent chez les patients cABMR, il existe également un défaut fonctionnel de ces LB dans leur capacité suppressive qui peut en partie expliquer le phénomène de rejet. Cependant, nous ne pouvons pas affirmer que ces mécanismes soient les seuls responsables de la régulation dans notre modèle. En effet, nous n'avons pas étudié le contact LT/LB au sein de nos cocultures. Pourtant, il a déjà été montré que les LB humains inhibent directement la prolifération des LT par contact cellule/cellule, menant notamment à l'apoptose des LT (Tretter et al. 2008;

Lemoine et al. 2011). Cependant, les différences en termes de fonction régulatrice des différentes populations de LB suggèrent que la collaboration B-T est bimodale, entraînant soit une réponse inflammatoire robuste, soit un signal tolérogène. Le LB en tant que médiateur tolérogène, facilite la génération de Tregs, tandis que le LB en tant qu'effecteur de l'inflammation contribue à l'expansion de LT alloréactifs. Nous démontrons ainsi toute une série d'éléments contribuant à la mise en place de mécanismes de régulation au sein des cocultures. Cependant, il est difficile de décrire une cinétique précise de ces événements. Nous pouvons imaginer deux hypothèses (figure 44). La première serait que les LB, une fois activés par le couple CpG et CD40/CD40L, par ses sécrétions de TGF $\beta$ , d'IL-10 et d'IDO ou alors par contact cellule/cellule avec le LT, contribuent à la génération de Tregs. La seconde consisterait plutôt à l'induction précoce de Tregs suite à l'interaction LT/LB. Ces Tregs à leur tour induiraient des Bregs, soit directement par contact cellulaire, soit par la sécrétion de cytokines. Ces Bregs induits quant à eux seraient alors capables de sécréter du TGF $\beta$  et IDO, qui contribuerait à nouveau à générer et maintenir le pool de Tregs. Il est pour le moment impossible de décrire étape par étape ce qui se passe réellement dans la culture. La question principale étant de savoir si ce sont les Tregs ou les Bregs qui sont les premiers présents lors de ces expériences. Pour y répondre, nous pourrions notamment analyser plus précocement, vers J1 ou J2, les marqueurs des Tregs et des Bregs. Ceci permettrait par exemple de voir si IDO est sécrétée en premier par le LB, ou si alors l'expression de Foxp3 est la première détectée. Ainsi, peut être verrions nous l'apparition précoce d'une de ces deux populations, ce qui signifierait inéluctablement qu'elle induit la deuxième population régulatrice. Ce qui semble certain, c'est que le contact LT/LB *via* la molécule CD40 est essentiel à la mise en place du processus de régulation. En effet, dans la littérature ainsi qu'au laboratoire, il a déjà été montré que le blocage de l'interaction CD40/CD40L abroge la régulation par le LB (Mizoguchi et al. 2000; Lemoine et al. 2011).





**Figure 44. L'apparition des cellules régulatrices en coculture.**

Dans l'hypothèse 1, des Bregs seraient déjà présents au départ de la coculture. Par contact cellulaire ou par la libération de cytokines, ces Bregs induiraient des Tregs. L'hypothèse 2 propose quant à elle que les Tregs soient les premières cellules régulatrices présentes au sein de la coculture. Ces Tregs pourraient par interaction directe avec les LB ou alors indirectement par la sécrétion de cytokines conduire à la génération de Bregs.

## 2. Dans le rejet cellulaire aigu

Le rôle du LB dans l'ACR semble différent de celui exercé dans le cABMR. Au vu de l'infiltrat de LB observé sur les coupes de biopsies des patients ACR, il paraît probable que le LB joue un rôle dans les mécanismes d'action du rejet cellulaire aigu, particulièrement par son versant pro-inflammatoire. En effet, en supposant que les mécanismes régulateurs soient efficaces chez ces patients, au vu de nos observations lors des cocultures autologues réalisées, nous nous sommes intéressés à un autre type de LT, le Th17. En parcourant la littérature, il est admis que les Th17 participent activement au phénomène de rejet cellulaire (Chen et al. 2009; Itoh et al. 2011). Cependant, il n'existe pas de données qui décrivent la relation LB/Th17 en transplantation. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés dans la suite de notre étude, à l'influence du LB sur les Th17, dans le contexte du rejet cellulaire aigu.



## 2.1. Le modèle de différenciation Th17

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre au point un modèle de différenciation de LT CD4<sup>+</sup> en Th17. Contrairement au modèle murin où la polarisation en Th17 est bien connue *via* les cytokines IL-6 et TGFβ, chez l'Homme les stimuli nécessaires à leur induction reste encore très ambigus. De nombreuses équipes travaillent sur les Th17, particulièrement en auto-immunité ou dans l'allergie, mais chaque groupe utilise son propre modèle. Ainsi, certains auteurs utilisent conjointement de l'IL-6 et de l'IL-1β (Acosta-Rodriguez et al. 2007) ou encore de l'IL-1β et de l'IL-23 (Wilson et al. 2007). Pour d'autres le TGFβ, l'IL-23, l'IL-6 et l'IL-1β sont toutes indispensables à la polarisation en Th17. Cette disparité d'un point de vue technique pose diverses questions quant à la nature des Th17 obtenus par chacun. Lors de cette thèse, nous avons répertorié le large panel de combinaisons de cytokines pouvant conduire au développement de Th17. Notre choix s'est porté sur l'utilisation combinée de l'IL-6 et du TGFβ, comme chez la souris. En effet, cette combinaison de cytokines est dorénavant la plus utilisée par les équipes de recherche chez l'Homme pour différencier des LT CD4<sup>+</sup> en Th17. De plus, elle s'est avérée être celle qui induit le plus de sécrétion d'IL-17 parmi les diverses combinaisons de cytokines testées lors du début du projet.

Afin de valider notre modèle *in vitro* de différenciation en Th17, les premières expériences ont consisté à mettre en évidence la production d'IL-17 par les LT cultivés avec de l'IL-6 et du TGFβ. Par ELISA, nous avons observé une forte sécrétion d'IL-17 lorsque les LT sont en présence d'IL-6 et de TGFβ. Cependant, le seul dosage de l'IL-17 dans les surnageants de culture ne suffit pas à affirmer que notre modèle est valide. Nous avons donc vérifié la présence des messagers de l'IL-17 et de RORc dans ces LT, des marqueurs caractéristiques des Th17. En présence des cytokines de différenciation en Th17, RORc est davantage exprimé à J7. Par ailleurs, ce facteur de transcription est très fortement exprimé dans les LT à J0. Ce résultat peut s'expliquer notamment par le fait que les LT à J0 sont des LT CD4<sup>+</sup> naïfs pour la plupart. N'étant pas encore entrés dans un processus de différenciation, ces LT expriment peut-être de nombreux facteurs de transcription dont celui de RORc. Ce résultat est corrélé à la présence du messager de l'IL-17 en condition de polarisation Th17, tandis qu'il est absent à J0 et dans des LT stimulés seulement par anti-CD3 et anti-CD28. Ces résultats confortent les travaux réalisés par ELISA et confirment ainsi la validité de notre modèle. Les LT stimulés par IL-6 et TGFβ expriment conjointement RORc et l'IL-17.

Dans le but d'étudier la relation LB et Th17, nous voulions avoir à disposition un ou des marqueurs spécifiques des Th17, utilisables en cytométrie, pour nous permettre une analyse plus fine de cette population de LT. La détection de l'IL-17 étant un échec, nous nous sommes focalisés sur d'autres marqueurs. Au vu de la littérature, les Th17 sont caractérisés par la forte expression de marqueurs de surface tels que le CCR6, l'IL-21R et l'IL-23R (Annunziato et al. 2007). L'analyse de l'IL-21R et de l'IL-23R ne nous apporte aucune informations complémentaires car leur expression est similaire que les LT soit ou non en condition de polarisation Th17. Par contre, le CCR6, un récepteur de chémokines fortement exprimé sur les Th17 (Annunziato et al. 2007), est détecté sur un pourcentage plus important de LT, lorsque ces derniers sont en présence d'IL-6 et de TGF $\beta$ . Cette observation se révèle être d'un réel intérêt pour discriminer des Th17 par cytométrie en flux. Cependant, il serait intéressant de pouvoir coupler le CCR6 à d'autres marqueurs pour s'assurer de la spécificité des cellules observées. En effet, il n'est pas exclu qu'au vu de l'ubiquitarité des chémokines dans le système immunitaire, d'autres LT puissent acquérir le CCR6 selon le microenvironnement.

## 2.2. La relation LB/Th17

Après avoir validé le modèle *in vitro* de différenciation en Th17, le second objectif ici a été d'étudier la relation entre LB et Th17. En effet, chez l'Homme, il existe peu d'éléments de réponse à ce sujet. Il a cependant récemment été montré que les LB transitionnels seraient capables d'inhiber la différenciation en Th17 (Flores-Borja et al. 2013). Cette information apporte un indice sur les résultats que nous pourrions trouver. Dans nos expériences, nous avons utilisé des LB totaux +/- CpG, en coculture avec des LT stimulés ou non par de l'IL-6 et du TGF $\beta$ . Afin d'éliminer une possible sécrétion d'IL-17 par les LB, nous avons tout d'abord recherché la présence du messenger de l'IL-17 dans des LB seuls en culture et selon différentes conditions de stimulation (+/- CpG ; +/- cytokines). Ni le messenger de l'IL-17, ni celui de RORc ne sont exprimés par le LB, et ce quelles que soient les conditions.

Nous avons par la suite vérifié la production d'IL-17 par ELISA dans les surnageants de cocultures LT/LB. Deux résultats en ressortent. Premièrement, lorsque les LB sont stimulés par du CpG en présence de LT sans cytokines, nous observons une augmentation de la production d'IL-17. Sans stimulation CpG, les LB ne sont pas capables d'induire cette cytokine. Il semblerait donc que le LB activé puisse induire des Th17. Ceci peut s'expliquer

par le fait que le LB activé, qui sécrète de l'IL-6 et du TGF $\beta$ , puisse être suffisant à lui seul pour générer des Th17. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions réaliser de nouvelles cocultures dans lesquelles seraient ajoutés des anticorps bloquants l'IL-6 et/ou le TGF $\beta$ . Si cette théorie s'avère valide, nous ne devrions plus détecter d'IL-17 dans les surnageants de culture suite à la neutralisation de ces cytokines. Ensuite, lorsque ces mêmes LB sont en présence de LT, d'IL-6 et de TGF $\beta$ , nous observons une diminution de l'IL17 dans les surnageants de culture, qu'ils soient activés ou non par du CpG. Dans ce cas, le LB joue un rôle régulateur négatif en inhibant la sécrétion d'IL-17 et donc a priori de Th17. Cependant, l'inhibition n'est pas totale car il reste toujours de l'IL-17 sécrétée. Dans ce cas précis, nous pouvons émettre l'hypothèse que le LB sous l'influence du TGF $\beta$ , s'affirme davantage comme un Breg afin d'inhiber la génération de Th17. Nous pourrions vérifier cette théorie en induisant dans un premier temps des Th17 par l'IL-6 et le TGF $\beta$ . Après 7 jours de différenciation, les Th17 générés seraient alors mis en culture avec des LB afin d'observer l'effet des LB sur la sécrétion d'IL-17. Les LB n'étant plus soumis à une stimulation par le TGF $\beta$ , nous devrions observer davantage d'IL-17 en culture. Cependant, cette expérience est difficile à mettre en place car la différenciation en Th17 dure 7 jours, et la seconde mise en culture de ces cellules poserait alors un problème de viabilité. Ces résultats laissent penser que le LB, selon l'environnement, soit capable de réguler la différenciation en Th17, soit en les augmentant, soit en les diminuant. Ces résultats ont été par la suite confirmés à l'aide du marqueur CCR6. En effet, le pourcentage de LT CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>fort</sup> est augmenté en présence de LB stimulés par du CpG, en absence de cytokines de différenciation. A l'inverse, en présence d'IL-6 et de TGF $\beta$ , le CCR6 est diminué, que les LB soient activés ou non. Ces résultats sont novateurs et viennent confirmer que le marqueur CCR6 est un bon indicateur de la différenciation en Th17. Même si ce ne sont que des prémices, le LB semble être un acteur important dans la régulation du Th17. Tantôt régulateur positif, tantôt régulateur négatif, selon l'environnement dans lequel il se trouve. Il serait intéressant de quantifier par la suite l'expression du message de l'IL-17 au cours des cocultures pour confirmer ces résultats.

Dans le cadre du rejet cellulaire aigu, ces résultats ouvrent de nombreuses pistes. En effet, au vu de l'implication du Th17 dans le rejet d'allogreffe, il serait intéressant d'étudier le LB dans cette relation LB/Th17 au cours du rejet. Nous pourrions imaginer réaliser le même type d'expérience mais avec des LT et des LB de patients ACR. Peut-être que les LT de patients ACR sont plus susceptibles de se différencier en Th17, ou alors ne subissent plus de

régulation par le LB. Les informations ainsi recueillies nous permettraient d'émettre de nouvelles hypothèses quant au rôle du LB au cours du rejet cellulaire aigu.

### **III. Les perspectives thérapeutiques dans le rejet**

#### **1. Les projets du laboratoire**

Dans cette étude, nous montrons ainsi pour la première fois une dysfonction des Bregs dans le rejet humoral chronique. Cependant, il serait également intéressant de savoir si le déséquilibre de distribution des LB observé chez les patients cABMR pourrait être prédictif du rejet humoral chronique. En effet, avant de développer leur rejet, nous pourrions vérifier si ce déséquilibre s'installe en amont chez ces patients. C'est pourquoi nous avons lancé une étude prospective sur une large cohorte de patients afin de vérifier l'évolution du compartiment B au cours de la greffe. Cette étude longitudinale permettrait ainsi de déterminer s'il existe une relation entre le phénotype des LB et leur fonction au cours de l'histoire naturelle du rejet humoral chronique. Nous avons ainsi à disposition pour chaque patient un échantillon sanguin avant greffe, ainsi que 3, 12 et 24 mois après greffe. A chaque échéance nous réalisons un phénotypage systématique des différentes populations de LB, ce qui nous permet d'observer l'évolution des populations B d'intérêt. Cette étude n'a jamais été réalisée avant et pourrait également permettre d'obtenir de nombreuses informations quant à l'influence des divers traitements immunosuppresseurs utilisés dans le maintien du greffon sur les populations de LB.

Une autre étude est également en vigueur sur le rejet humoral chronique, nommée « BHL (B cell lymphocyte in Humoral rejection and allo immunisation) » et qui fait partie d'une collaboration entre 14 centres de transplantation en France. En effet, les patients cABMR présentent un nombre important de DSA, mais il existe également des patients avec des DSA qui ne font pas de rejet par la suite. Il est intéressant de suivre ces patients DSA positifs, de les comparer à des patients qui développent un rejet humoral chronique et d'observer si la présence de DSA est prédictive du rejet humoral chronique.

#### **2. Les thérapies anti-LB**

Depuis les vingt dernières années, les stratégies d'immunosuppression dans la transplantation d'organes visent essentiellement les LT, soit par leur déplétion, soit par

inhibition de leur fonction. Cependant, l'intérêt grandissant du LB dans la réponse immune à l'allogreffe font de ce dernier une nouvelle cible thérapeutique majeure. Il est important de bien comprendre qu'il n'existe pas un LB mais des LB, avec des marqueurs de surface et des fonctions qui diffèrent. Le rôle du LB dans la présentation antigénique et l'activation des LT CD4<sup>+</sup> alloréactifs en transplantation justifie le fait de dépléter les LB au moment de la transplantation afin d'empêcher une réponse T exacerbée. Outre la splénectomie, les stratégies thérapeutiques couramment utilisées consistent généralement à l'administration d'anticorps cytotoxiques qui lient les antigènes ciblés à la surface des LB. Dans un modèle de greffe cardiaque par exemple, la déficience de LB dans sa capacité à présenter l'antigène, par l'absence de molécules CMH II, réduit considérablement le risque de rejet cellulaire (Noorchashm et al. 2006). Il a également été montré que ces LB présents dans l'allogreffe présentent les auto-antigènes aux LT afin de promouvoir leur activation, leur différenciation, et leur sécrétion de cytokine pro-inflammatoires. Ainsi, l'utilisation du rituximab, un anticorps monoclonal chimérique murin-humain dirigé contre le CD20 a fait ses preuves en transplantation. Un certain nombre de résultats suggère que le rituximab déplete les LB dans l'allogreffe (Zarkhin et al. 2010). Cette déplétion en LB est de plus couplée à une diminution du nombre de DSA (Fehr et al. 2009; Vo et al. 2010).

Chez l'Homme, le rituximab réduit également l'incidence du rejet aigu dans la greffe de rein (Tyden et al. 2009). Cependant, le moment auquel le rituximab doit être administré demeure encore un mystère. En effet, cet anticorps cible tous les LB, qu'ils soient pro-inflammatoires ou régulateurs. Ainsi la déplétion totale des LB paraît être potentiellement un risque pour le maintien de l'allogreffe en altérant la modulation inhibitrice de la réponse immune. De récentes données ont par exemple montré dans un modèle de greffe de peau murin, une accélération du rejet d'allogreffe corrélée à une suractivation des LT CD4<sup>+</sup>, suite à la déplétion du compartiment B par le rituximab (DiLillo et al. 2011). Une étude sur 120 patients ayant reçu du rituximab comme thérapie d'induction avant la transplantation a été arrêtée prématurément suite à une augmentation de l'incidence du rejet cellulaire aigu chez 83% de ces patients (Clatworthy et al. 2009). Cette étude démontre que la déplétion totale et précoce du compartiment B n'est pas une solution dans la lutte contre le rejet, mais qu'au contraire ce traitement semble éliminer les cellules régulatrices B qui freinent la réponse immune. Par ailleurs, il a déjà été montré chez la souris que la déplétion des LB par un anticorps anti-CD20 a deux conséquences sur la progression de l'EAE, selon le moment de la déplétion en LB. Une déplétion des LB avant l'induction de l'EAE aggrave la sévérité de la

pathologie alors qu'une déplétion au cours de la phase aiguë de la maladie diminue les symptômes (Matsushita et al. 2008). Ce résultat s'explique par le fait que la déplétion des LB de façon précoce avant l'induction de la maladie élimine la population de Bregs, et donc leur rôle inhibiteur sur la maladie. En revanche, la déplétion des LB au cours de la progression de la maladie affecte principalement les LB effecteurs, ce qui empêche l'activation des LT CD4<sup>+</sup> résultant en une diminution de la sévérité de la maladie. Ainsi, dans notre étude, la déplétion totale des LB chez les patients qui développent un rejet humoral chronique ne semble pas être une solution à adopter pour prévenir le phénomène de rejet. Ainsi, la déplétion des populations B mémoires pourrait s'avérer être une bonne solution pour éviter les conséquences désastreuses du rejet humoral chronique et ainsi diminuer la production d'anticorps au cours du rejet. Cependant, l'élimination des populations régulatrices telles que les LB transitionnels aurait des effets dévastateurs.

Les stratégies thérapeutiques actuelles sont ainsi remises en cause et de nouvelles thérapies ciblées en fonction des malades font leur apparition. Afin d'améliorer la tolérance en transplantation, il est par exemple proposé de moduler l'activation des lymphocytes B. Toutefois, prévenir l'activation des lymphocytes B spécifiques de l'antigène nécessite l'identification de l'antigène responsable de la stimulation du BCR. Le blocage des récepteurs de costimulation comme le CD19 ou le CD21 ou la stimulation de récepteurs inhibiteurs tels que le CD22 pourrait engendrer un effet bénéfique par l'inhibition de l'activation des lymphocytes B et leur prolifération. Dans ce contexte, l'anticorps monoclonal anti-CD22 humanisé, epratuzumab, a été utilisé avec succès dans le LES. Il conduit à une diminution de 35% des LB totaux et de façon concomitante inhibe l'activation des LB ainsi que leur prolifération (Dorner et al. 2006). L'induction et le maintien de la tolérance fondé sur la déplétion des LB ou sur l'inhibition de l'activation des LB semblent ainsi être des approches intéressantes en transplantation.

### **3. Les thérapies pro-Bregs**

Au vu des avancées sur l'identification et les mécanismes d'action des Bregs, il semble ainsi intéressant de développer des options alternatives aux stratégies existantes pour favoriser le développement des Bregs au détriment des LB stimulateurs. Une possibilité de promouvoir la tolérance pourrait être d'expander *in vivo* des Bregs. Par exemple, l'administration d'un anticorps anti-CD40 activateur chez des patients receveurs, avant ou au

moment de la transplantation, pourrait être une piste à explorer. Cependant, l'activation de cette voie représente un risque puisqu'elle pourrait également activer des cellules B effectrices pro-inflammatoires. Il est donc nécessaire avant tout d'établir une meilleure caractérisation phénotypique des Bregs chez l'Homme ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes fonctionnels de ces Bregs dans la réponse immunitaire *in vivo*. Des études suggèrent également que les LB périphériques pourraient être manipulés *ex vivo* via le CD40 et les TLRs afin d'induire leur potentiel suppressif (DiLillo et al. 2010). Ces cellules pourraient être par la suite réinjectées aux patients receveurs dans le but de favoriser le processus de tolérance avant transplantation. Ainsi, la possibilité de générer des Bregs pouvant être utilisés en thérapie, et donc en transplantation, s'avère particulièrement intéressant pour l'avenir.

La découverte de nouveaux marqueurs des Bregs conduit également à l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, l'utilisation d'anticorps anti-TIM1 s'avère intéressant en transplantation. En effet, l'administration d'un anti-TIM-1 dans un modèle de greffe cardiaque permet de prolonger la survie de la greffe, associée à un switch des Th1 vers les Th2 (Ueno et al. 2008). Il a également été démontré que l'anti-TIM-1 est capable d'empêcher la mise en place de la résistance à la tolérance générée par les LT CD8<sup>+</sup> (Yuan et al. 2009). Cet anti-TIM-1 semble ainsi pouvoir prévenir la réponse immunitaire allergique Th1 et inhiber les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques tout en préservant la tolérance. L'expression du GITRL sur les LB représente également un intérêt en transplantation mais son rôle est controversé. En effet, il a été mis en évidence dans un modèle murin de greffe de cornée que le blocage de l'interaction GTR-GITRL entre LB et Tregs augmente les lésions de l'endothélium cornéen conduisant ainsi au rejet (Hori et al. 2010). Cependant dans un modèle murin de greffe de peau, il a été démontré que le blocage de cette interaction prolonge la survie de la greffe et ce phénomène est dépendant des Tregs (Kim et al. 2010). Le couple GTR-GITRL semble ainsi être une voie à explorer dans la transplantation mais demande encore une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action.

Comme nous l'avons montré dans cette étude, IDO semble être une enzyme immunosuppressive importante dans les mécanismes de régulation du LB. Ainsi, IDO est également évoquée en transplantation. La surexpression d'IDO permet en effet de prolonger la survie du greffon en transplantation, mais le mécanisme n'est pas clair (Beutelspacher et al. 2006; Yu et al. 2008). De plus, un lien entre Tregs et IDO a été mis en évidence dans le cas de



la tolérance d'allogreffe. En effet, l'expression IDO par les cellules dendritiques induit l'acceptation d'une greffe de peau par induction de Tregs (Yu et al. 2008). Un autre groupe décrit également une interaction entre IDO et Tregs via la stimulation du cytotoxique T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4), ce qui induit à long terme la survie d'une allogreffe cardiaque (Sucher et al. 2012). Ainsi, de nombreuses avancées ont été réalisées dans des modèles murins, mais la connaissance est encore inachevée. Cependant, deux concepts existent: IDO favorise la tolérance ou IDO facilite le rejet. D'une part, l'importance d'IDO a été observée dans des études d'allogreffes rénales humaines. Comme chez la souris, la sécrétion de cette enzyme est liée au développement de Tregs et la survie du greffon (Ge et al. 2010). D'autre part, l'expression d'IDO peut être un précurseur de rejet. Par exemple, dans la greffe de rein, le rejet aigu est associé à une importante activité catalytique d'IDO chez les patients et les biopsies de ces patients présentent une forte positivité pour IDO (Brandacher et al. 2007). Ainsi, l'expression d'IDO ne semble pas toujours être un marqueur de bon pronostic afin de prévenir le rejet final (Hautz et al. 2009). Finalement, le rôle d'IDO dans la transplantation reste incertain, notamment parce que la régulation de la mécanique entre l'expression d'IDO et l'expression de Foxp3 reste à étudier.

En conclusion, il a été démontré en transplantation que le LB peut conduire au rejet du greffon ou à la tolérance. Les stratégies thérapeutiques utilisées ciblent les LB afin d'éviter une activation exacerbée des LT qui engendre une forte réponse alloimmune. Cependant au vu des résultats précédents, il est important de considérer tous les aspects du LB, pas seulement comme médiateurs immuns inflammatoires de la réponse immunitaire, mais aussi comme signal tolérogénique important. C'est pourquoi il semble primordial de développer de nouvelles thérapeutiques pour favoriser l'effet tolérogène du LB au détriment de son versant inflammatoire, afin d'améliorer la survie du greffon. Cette nouvelle voie qui s'ouvre en transplantation demande cependant une meilleure compréhension du LB, en particulier des Bregs et des mécanismes fonctionnels associés.



<p><b>REFERENCES</b> <b>BIBLIOGRAPHIQUES</b></p>
--

- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." *Nat Immunol* **8**(9): 942-949.
- Agorogiannis, E. I., F. S. Regateiro, D. Howie, H. Waldmann and S. P. Cobbold (2012). "Th17 cells induce a distinct graft rejection response that does not require IL-17A." *Am J Transplant* **12**(4): 835-845.
- Ahmed, R. and D. Gray (1996). "Immunological memory and protective immunity: understanding their relation." *Science* **272**(5258): 54-60.
- Amu, S., S. P. Saunders, M. Kronenberg, N. E. Mangan, A. Atzberger and P. G. Fallon (2010). "Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model." *J Allergy Clin Immunol* **125**(5): 1114-1124 e1118.
- Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi and S. Romagnani (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." *J Exp Med* **204**(8): 1849-1861.
- Antonyamy, M. A., W. C. Fanslow, F. Fu, W. Li, S. Qian, A. B. Troutt and A. W. Thomson (1999). "Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors." *J Immunol* **162**(1): 577-584.
- Asadullah, K., W. Sterry and H. D. Volk (2003). "Interleukin-10 therapy--review of a new approach." *Pharmacol Rev* **55**(2): 241-269.
- Axtell, R. C., L. Xu, S. R. Barnum and C. Raman (2006). "CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system." *J Immunol* **177**(12): 8542-8549.
- Barr, T. A., S. Brown, G. Ryan, J. Zhao and D. Gray (2007). "TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells." *Eur J Immunol* **37**(11): 3040-3053.
- Bemark, M., J. Holmqvist, J. Abrahamsson and K. Mellgren (2012). "Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes." *Clin Exp Immunol* **167**(1): 15-25.
- Benghiat, F. S., L. M. Charbonnier, B. Vokaer, V. De Wilde and A. Le Moine (2009). "Interleukin 17-producing T helper cells in alloimmunity." *Transplant Rev (Orlando)* **23**(1): 11-18.
- Beutelspacher, S. C., P. H. Tan, M. O. McClure, D. F. Larkin, R. I. Lechler and A. J. George (2006). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by endothelial cells: implications for the control of alloresponses." *Am J Transplant* **6**(6): 1320-1330.
- Binard, A., L. Le Pottier, V. Devauchelle-Pensec, A. Saraux, P. Youinou and J. O. Pers (2009). "Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjogren syndrome?" *Ann Rheum Dis* **68**(9): 1447-1452.
- Blair, P. A., K. A. Chavez-Rueda, J. G. Evans, M. J. Shlomchik, A. Eddaoudi, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein and C. Mauri (2009). "Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice." *J Immunol* **182**(6): 3492-3502.
- Blair, P. A., L. Y. Norena, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein and C. Mauri (2010). "CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients." *Immunity* **32**(1): 129-140.
- Bohnhorst, J. O., M. B. Bjorgan, J. E. Thoen, J. B. Natvig and K. M. Thompson (2001). "Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome." *J Immunol* **167**(7): 3610-3618.
- Bouaziz, J. D., S. Calbo, M. Maho-Vaillant, A. Saussine, M. Bagot, A. Bensussan and P. Musette (2010). "IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro." *Eur J Immunol* **40**(10): 2686-2691.
- Bouaziz, J. D., K. Yanaba and T. F. Tedder (2008). "Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation." *Immunol Rev* **224**: 201-214.

- Brandacher, G., F. Cakar, C. Winkler, S. Schneeberger, P. Obrist, C. Bosmuller, G. Werner-Felmayer, E. R. Werner, H. Bonatti, R. Margreiter and D. Fuchs (2007). "Non-invasive monitoring of kidney allograft rejection through IDO metabolism evaluation." *Kidney Int* **71**(1): 60-67.
- Brouard, S., A. Dupont, M. Giral, S. Louis, D. Lair, C. Braudeau, N. Degauque, F. Moizant, A. Pallier, C. Ruiz, M. Guillet, D. Laplaud and J. P. Souillou (2005). "Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation." *Am J Transplant* **5**(2): 330-340.
- Brown, K., S. H. Sacks and W. Wong (2011). "Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection." *Eur J Immunol* **41**(1): 89-96.
- Browne, E. P. (2012). "Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors." *Immunology* **136**(4): 370-379.
- Burns, A. M. and A. S. Chong (2011). "Alloantibodies prevent the induction of transplantation tolerance by enhancing alloreactive T cell priming." *J Immunol* **186**(1): 214-221.
- Burns, A. M., L. Ma, Y. Li, D. Yin, J. Shen, J. Xu and A. S. Chong (2009). "Memory alloreactive B cells and alloantibodies prevent anti-CD154-mediated allograft acceptance." *J Immunol* **182**(3): 1314-1324.
- Carsetti, R., M. M. Rosado and H. Wardmann (2004). "Peripheral development of B cells in mouse and man." *Immunol Rev* **197**: 179-191.
- Chen, J., J. Xu, Q. Wang, T. Wang, A. Sciammas and A. S. Chong (2011). "A non-redundant role for IL-10 produced by B cells in the maintenance of murine heart allograft tolerance." *Am J Transplant* **11**: 517.
- Chen, L., E. Ahmed, T. Wang, Y. Wang, J. Ochando, A. S. Chong and M. L. Alegre (2009). "TLR signals promote IL-6/IL-17-dependent transplant rejection." *J Immunol* **182**(10): 6217-6225.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med* **198**(12): 1875-1886.
- Chen, X. and P. E. Jensen (2007). "Cutting edge: primary B lymphocytes preferentially expand allogeneic FoxP3+ CD4 T cells." *J Immunol* **179**(4): 2046-2050.
- Chung, J. B., M. Silverman and J. G. Monroe (2003). "Transitional B cells: step by step towards immune competence." *Trends Immunol* **24**(6): 343-349.
- Clatworthy, M. R., C. J. Watson, G. Plotnek, V. Bardsley, A. N. Chaudhry, J. A. Bradley and K. G. Smith (2009). "B-cell-depleting induction therapy and acute cellular rejection." *N Engl J Med* **360**(25): 2683-2685.
- Cohen, D. J., L. St Martin, L. L. Christensen, R. D. Bloom and R. S. Sung (2006). "Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1995-2004." *Am J Transplant* **6**(5 Pt 2): 1153-1169.
- Colvin, R. B., T. Hirohashi, A. B. Farris, F. Minnei, A. B. Collins and R. N. Smith (2010). "Emerging role of B cells in chronic allograft dysfunction." *Kidney Int Suppl* **119**: S13-17.
- Correale, J., M. Farez and G. Razzitte (2008). "Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells." *Ann Neurol* **64**(2): 187-199.
- Costantini, A., S. Mancini, S. Giuliodoro, L. Butini, C. M. Regnery, G. Silvestri and M. Montroni (2003). "Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function." *J Immunol Methods* **278**(1-2): 145-155.
- Cottrez, F., S. D. Hurst, R. L. Coffman and H. Groux (2000). "T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo." *J Immunol* **165**(9): 4848-4853.
- Croitoru-Lamoury, J., F. M. Lamoury, M. Caristo, K. Suzuki, D. Walker, O. Takikawa, R. Taylor and B. J. Brew (2011). "Interferon-gamma regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO)." *PLoS One* **6**(2): e14698.
- Das, A., G. Ellis, C. Pallant, A. R. Lopes, P. Khanna, D. Peppas, A. Chen, P. Blair, G. Dusheiko, U. Gill, P. T. Kennedy, M. Brunetto, P. Lampertico, C. Mauri and M. K. Maini (2012). "IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection." *J Immunol* **189**(8): 3925-3935.
- de Souza, A. J. and L. P. Kane (2006). "Immune regulation by the TIM gene family." *Immunol Res* **36**(1-3): 147-155.

- de Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel and J. E. de Vries (1991). "Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression." *J Exp Med* **174**(4): 915-924.
- Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti and S. Romagnani (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production." *J Immunol* **150**(2): 353-360.
- Demydenko, D. (2010). "c-Cbl mediated ubiquitylation and regulation of cell surface exposure of CD5." *Biochem Biophys Res Commun* **392**(4): 500-504.
- Dennehy, K. M., R. Broszeit, W. F. Ferris and A. D. Beyers (1998). "Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5." *Eur J Immunol* **28**(5): 1617-1625.
- Deteix, C., V. Attuill-Audenis, A. Duthey, N. Patey, B. McGregor, V. Dubois, G. Caligiuri, S. Graff-Dubois, E. Morelon and O. Thaumat (2010). "Intragraft Th17 infiltrate promotes lymphoid neogenesis and hastens clinical chronic rejection." *J Immunol* **184**(9): 5344-5351.
- Diaz, J. A., A. J. Booth, G. Lu, S. C. Wood, D. J. Pinsky and D. K. Bishop (2009). "Critical role for IL-6 in hypertrophy and fibrosis in chronic cardiac allograft rejection." *Am J Transplant* **9**(8): 1773-1783.
- DiLillo, D. J., R. Griffiths, S. V. Seshan, C. M. Magro, P. Ruiz, T. M. Coffman and T. F. Tedder (2011). "B lymphocytes differentially influence acute and chronic allograft rejection in mice." *J Immunol* **186**(4): 2643-2654.
- DiLillo, D. J., T. Matsushita and T. F. Tedder (2010). "B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer." *Ann N Y Acad Sci* **1183**: 38-57.
- Ding, Q., M. Yeung, G. Camirand, Q. Zeng, H. Akiba, H. Yagita, G. Chalasani, M. H. Sayegh, N. Najafian and D. M. Rothstein (2011). "Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice." *J Clin Invest* **121**(9): 3645-3656.
- Dorner, T., J. Kaufmann, W. A. Wegener, N. Teoh, D. M. Goldenberg and G. R. Burmester (2006). "Initial clinical trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) for immunotherapy of systemic lupus erythematosus." *Arthritis Res Ther* **8**(3): R74.
- Duddy, M., M. Niino, F. Adatia, S. Hebert, M. Freedman, H. Atkins, H. J. Kim and A. Bar-Or (2007). "Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis." *J Immunol* **178**(10): 6092-6099.
- Evans, J. G., K. A. Chavez-Rueda, A. Eddaoudi, A. Meyer-Bahlburg, D. J. Rawlings, M. R. Ehrenstein and C. Mauri (2007). "Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis." *J Immunol* **178**(12): 7868-7878.
- Fehr, T., B. Rusi, A. Fischer, H. Hopfer, R. P. Wuthrich and A. Gaspert (2009). "Rituximab and intravenous immunoglobulin treatment of chronic antibody-mediated kidney allograft rejection." *Transplantation* **87**(12): 1837-1841.
- Fillatreau, S., C. H. Sweeney, M. J. McGeachy, D. Gray and S. M. Anderton (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." *Nat Immunol* **3**(10): 944-950.
- Flores-Borja, F., A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M. R. Ehrenstein, D. A. Isenberg and C. Mauri (2013). "CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation." *Sci Transl Med* **5**(173): 173ra123.
- Fujii, S., K. Shimizu, T. Shimizu and M. T. Lotze (2001). "Interleukin-10 promotes the maintenance of antitumor CD8(+) T-cell effector function in situ." *Blood* **98**(7): 2143-2151.
- Gandhi, R., M. F. Farez, Y. Wang, D. Kozoriz, F. J. Quintana and H. L. Weiner (2010). "Cutting edge: human latency-associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset." *J Immunol* **184**(9): 4620-4624.
- Ge, W., J. Jiang, J. Arp, W. Liu, B. Garcia and H. Wang (2010). "Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression." *Transplantation* **90**(12): 1312-1320.

- Gillan, V., R. A. Lawrence and E. Devaney (2005). "B cells play a regulatory role in mice infected with the L3 of *Brugia pahangi*." *Int Immunol* **17**(4): 373-382.
- Go, N. F., B. E. Castle, R. Barrett, R. Kastelein, W. Dang, T. R. Mosmann, K. W. Moore and M. Howard (1990). "Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells." *J Exp Med* **172**(6): 1625-1631.
- Godin-Ethier, J., L. A. Hanafi, J. B. Duvignaud, D. Leclerc and R. Lapointe (2011). "IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli and TLR engagement is biologically inactive." *Mol Immunol* **49**(1-2): 253-259.
- Gokmen, M. R., G. Lombardi and R. I. Lechler (2008). "The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation." *Curr Opin Immunol* **20**(5): 568-574.
- Goldstein, D. R. (2006). "Toll like receptors and acute allograft rejection." *Transpl Immunol* **17**(1): 11-15.
- Gray, D., M. Gray and T. Barr (2007). "Innate responses of B cells." *Eur J Immunol* **37**(12): 3304-3310.
- Griffin, D. O. and T. L. Rothstein (2012). "Human "orchestrator" CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity." *Mol Med* **18**: 1003-1008.
- Hafler, D. A. and V. Kuchroo (2008). "TIMs: central regulators of immune responses." *J Exp Med* **205**(12): 2699-2701.
- Harris, D. P., L. Haynes, P. C. Sayles, D. K. Duso, S. M. Eaton, N. M. Lepak, L. L. Johnson, S. L. Swain and F. E. Lund (2000). "Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells." *Nat Immunol* **1**(6): 475-482.
- Hautz, T., G. Brandacher, B. Zelger, H. G. Muller, A. W. Lee, D. Fuchs, R. Margreiter and S. Schneeberger (2009). "Indoleamine 2,3-dioxygenase and foxp3 expression in skin rejection of human hand allografts." *Transplant Proc* **41**(2): 509-512.
- Herrera, O. B., D. Golshayan, R. Tibbott, F. Salcido Ochoa, M. J. James, F. M. Marelli-Berg and R. I. Lechler (2004). "A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells." *J Immunol* **173**(8): 4828-4837.
- Hori, J., H. Taniguchi, M. Wang, M. Oshima and M. Azuma (2010). "GITR ligand-mediated local expansion of regulatory T cells and immune privilege of corneal allografts." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**(12): 6556-6565.
- Hume, D. M., J. P. Merrill, B. F. Miller and G. W. Thorn (1955). "Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases." *J Clin Invest* **34**(2): 327-382.
- Hussain, S. and T. L. Delovitch (2007). "Intravenous transfusion of BCR-activated B cells protects NOD mice from type 1 diabetes in an IL-10-dependent manner." *J Immunol* **179**(11): 7225-7232.
- Hwang, H. S., J. H. Song, B. J. Hyoung, S. Y. Lee, Y. J. Jeon, S. H. Kang, B. H. Chung, B. S. Choi, Y. J. Choi, J. I. Kim, I. S. Moon, Y. S. Kim and C. W. Yang (2010). "Clinical impacts of CD38+ B cells on acute cellular rejection with CD20+ B cells in renal allograft." *Transplantation* **89**(12): 1489-1495.
- Inoue, S., W. W. Leitner, B. Golding and D. Scott (2006). "Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity." *Cancer Res* **66**(15): 7741-7747.
- Itoh, S., N. Kimura, R. C. Axtell, J. B. Velotta, Y. Gong, X. Wang, N. Kajiwar, A. Nambu, E. Shimura, H. Adachi, Y. Iwakura, H. Saito, K. Okumura, K. Sudo, L. Steinman, R. C. Robbins, S. Nakae and M. P. Fischbein (2011). "Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion." *Circulation* **124**(11 Suppl): S187-196.
- Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro, A. D. Williams, R. P. Hall, E. W. St Clair and T. F. Tedder (2011). "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells." *Blood* **117**(2): 530-541.
- Jeannet, M., V. W. Pinn, M. H. Flax, H. J. Winn and P. S. Russell (1970). "Humoral antibodies in renal allotransplantation in man." *N Engl J Med* **282**(3): 111-117.
- Jiang, S., O. Herrera and R. I. Lechler (2004). "New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance." *Curr Opin Immunol* **16**(5): 550-557.



- Johnson, B. A., 3rd, D. J. Kahler, B. Baban, P. R. Chandler, B. Kang, M. Shimoda, P. A. Koni, J. Pihkala, B. Vilagos, M. Busslinger, D. H. Munn and A. L. Mellor (2010). "B-lymphoid cells with attributes of dendritic cells regulate T cells via indoleamine 2,3-dioxygenase." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10644-10648.
- Kaminski, D. A., C. Wei, Y. Qian, A. F. Rosenberg and I. Sanz (2012). "Advances in human B cell phenotypic profiling." Front Immunol **3**: 302.
- Karnell, J. L., F. G. Karnell, 3rd, G. L. Stephens, B. Rajan, C. Morehouse, Y. Li, B. Swerdlow, M. Wilson, R. Goldbach-Mansky, C. Groves, A. J. Coyle, R. Herbst and R. Ettinger (2011). "Mycophenolic acid differentially impacts B cell function depending on the stage of differentiation." J Immunol **187**(7): 3603-3612.
- Katz, S. I., D. Parker and J. L. Turk (1974). "B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions." Nature **251**(5475): 550-551.
- Kim, J. I., S. B. Sonawane, M. K. Lee, S. H. Lee, P. E. Duff, D. J. Moore, M. R. O'Connor, M. M. Lian, S. Deng, Y. Choi, H. Yeh, A. J. Caton and J. F. Markmann (2010). "Blockade of GITR-GITRL interaction maintains Treg function to prolong allograft survival." Eur J Immunol **40**(5): 1369-1374.
- Kim, S. H., E. J. Oh, J. Y. Ghee, H. K. Song, D. H. Han, H. E. Yoon, B. S. Choi, S. K. Yoon, J. Y. Choi, I. S. Moon, D. G. Kim and C. W. Yang (2009). "Clinical significance of monitoring circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in kidney transplantation during the early posttransplant period." J Korean Med Sci **24 Suppl**: S135-142.
- Lal, G., Y. Nakayama, B. E. Burrell, Y. Ding and J. Bromberg (2011). "Non-humoral function of B cells is required for tolerance." Am J Transplant **11**: 105.
- Lampropoulou, V., K. Hoehlig, T. Roch, P. Neves, E. Calderon Gomez, C. H. Sweeney, Y. Hao, A. A. Freitas, U. Steinhoff, S. M. Anderton and S. Fillatreau (2008). "TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity." J Immunol **180**(7): 4763-4773.
- Land, W. (2007). "Innate alloimmunity: history and current knowledge." Exp Clin Transplant **5**(1): 575-584.
- Le Texier, L., P. Thebault, A. Lavault, C. Usal, E. Merieau, T. Quillard, B. Charreau, J. P. Soulillou, M. C. Cuturi, S. Brouard and E. Chiffolleau (2011). "Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile." Am J Transplant **11**(3): 429-438.
- LeBien, T. W. and T. F. Tedder (2008). "B lymphocytes: how they develop and function." Blood **112**(5): 1570-1580.
- Lemoine, S., A. Morva, P. Youinou and C. Jamin (2011). "Human T cells induce their own regulation through activation of B cells." J Autoimmun **36**(3-4): 228-238.
- Lenert, P., R. Brummel, E. H. Field and R. F. Ashman (2005). "TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production." J Clin Immunol **25**(1): 29-40.
- Levy, Y. and J. C. Brouet (1994). "Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein." J Clin Invest **93**(1): 424-428.
- Li, L., L. Huang, A. L. Vergis, H. Ye, A. Bajwa, V. Narayan, R. M. Strieter, D. L. Rosin and M. D. Okusa (2010). "IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury." J Clin Invest **120**(1): 331-342.
- Li, X., H. Zhong, W. Bao, N. Boulad, J. Evangelista, M. A. Haider, J. Bussel and K. Yazdanbakhsh (2012). "Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia." Blood **120**(16): 3318-3325.
- Lindner, S., K. Dahlke, K. Sontheimer, M. Hagn, C. Kaltenmeier, T. F. Barth, T. Beyer, F. Reister, D. Fabricius, R. Lotfi, O. Lunov, G. U. Nienhaus, T. Simmet, R. Kreienberg, P. Moller, H. Schrezenmeier and B. Jahrsdorfer (2013). "Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells." Cancer Res **73**(8): 2468-2479.
- Liu, H. and C. Rohowsky-Kochan (2008). "Regulation of IL-17 in human CCR6+ effector memory T cells." J Immunol **180**(12): 7948-7957.
- Liu, Y. J. and J. Banchereau (1997). "Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells." Semin Immunol **9**(4): 235-240.

- Loong, C. C., H. G. Hsieh, W. Y. Lui, A. Chen and C. Y. Lin (2002). "Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection." J Pathol **197**(3): 322-332.
- Louis, S., C. Braudeau, M. Giral, A. Dupont, F. Moizant, N. Robillard, A. Moreau, J. P. Souillou and S. Brouard (2006). "Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance." Transplantation **81**(3): 398-407.
- Lundy, S. K. (2009). "Killer B lymphocytes: the evidence and the potential." Inflamm Res.
- Mann, M. K., K. Maresz, L. P. Shriver, Y. Tan and B. N. Dittel (2007). "B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **178**(6): 3447-3456.
- Martins, H. L., C. Silva, D. Martini and I. L. Noronha (2007). "Detection of B lymphocytes (CD20+) in renal allograft biopsy specimens." Transplant Proc **39**(2): 432-434.
- Matsushita, T., K. Yanaba, J. D. Bouaziz, M. Fujimoto and T. F. Tedder (2008). "Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression." J Clin Invest **118**(10): 3420-3430.
- Mauri, C. and P. A. Blair (2010). "Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies." Nat Rev Rheumatol **6**(11): 636-643.
- Mauri, C., D. Gray, N. Mushtaq and M. Londei (2003). "Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells." J Exp Med **197**(4): 489-501.
- Mauri, C., L. T. Mars and M. Londei (2000). "Therapeutic activity of agonistic monoclonal antibodies against CD40 in a chronic autoimmune inflammatory process." Nat Med **6**(6): 673-679.
- Mengel, M., W. Gwinner, A. Schwarz, R. Bajeski, I. Franz, V. Brocker, T. Becker, M. Neipp, J. Klempnauer, H. Haller and H. Kreipe (2007). "Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts." Am J Transplant **7**(2): 356-365.
- Mezrich, J. D., J. H. Fechner, X. Zhang, B. P. Johnson, W. J. Burlingham and C. A. Bradfield (2010). "An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells." J Immunol **185**(6): 3190-3198.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, R. N. Smith, F. I. Preffer and A. K. Bhan (1997). "Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice." J Exp Med **186**(10): 1749-1756.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R. S. Blumberg and A. K. Bhan (2002). "Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation." Immunity **16**(2): 219-230.
- Mizoguchi, E., A. Mizoguchi, F. I. Preffer and A. K. Bhan (2000). "Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease." Int Immunol **12**(5): 597-605.
- Mocellin, S., F. M. Marincola and H. A. Young (2005). "Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint." J Leukoc Biol **78**(5): 1043-1051.
- Montandon, R., S. Korniotis, E. Layseca-Espinosa, C. Gras, J. Megret, S. Ezine, M. Dy and F. Zavala (2013). "Innate pro-B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(24): E2199-2208.
- Morris, P. J., M. R. Mickey, D. P. Singal and P. I. Terasaki (1969). "Serotyping for homotransplantation. XXII. Specificity of cytotoxic antibodies developing after renal transplantation." Br Med J **1**(5646): 758-759.
- Moulin, V., F. Andris, K. Thielemans, C. Maliszewski, J. Urbain and M. Moser (2000). "B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation." J Exp Med **192**(4): 475-482.
- Munn, D. H. and A. L. Mellor (2012). "Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses." Trends Immunol.
- Neta, R. and S. B. Salvin (1974). "Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity." J Immunol **113**(6): 1716-1725.
- Newell, K. A., A. Asare, A. D. Kirk, T. D. Gisler, K. Bourcier, M. Suthanthiran, W. J. Burlingham, W. H. Marks, I. Sanz, R. I. Lechler, M. P. Hernandez-Fuentes, L. A. Turka and V. L. Seyfert-Margolis (2010). "Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans." J Clin Invest **120**(6): 1836-1847.

- Nogueira, E., V. C. Ponciano, E. L. Naka, G. D. Marques, M. A. Cenedeze, N. O. Camara and A. Pacheco-Silva (2009). "Toll-like receptors-related genes in kidney transplant patients with chronic allograft nephropathy and acute rejection." *Int Immunopharmacol* **9**(6): 673-676.
- Noorchashm, H., A. J. Reed, S. Y. Rostami, R. Mozaffari, G. Zekavat, B. Koeberlein, A. J. Caton and A. Naji (2006). "B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection." *J Immunol* **177**(11): 7715-7722.
- O'Garra, A., R. Chang, N. Go, R. Hastings, G. Haughton and M. Howard (1992). "Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10." *Eur J Immunol* **22**(3): 711-717.
- Oberholzer, A., C. Oberholzer, K. S. Bahjat, R. Ungaro, C. L. Tannahill, M. Murday, F. R. Bahjat, Z. Abouhamze, V. Tsai, D. LaFace, B. Hutchins, L. L. Moldawer and M. J. Clare-Salzler (2002). "Increased survival in sepsis by in vivo adenovirus-induced expression of IL-10 in dendritic cells." *J Immunol* **168**(7): 3412-3418.
- Olkhanud, P. B., B. Damdinsuren, M. Bodogai, R. E. Gress, R. Sen, K. Wejksza, E. Malchinkhuu, R. P. Wersto and A. Biragyn (2011). "Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells." *Cancer Res* **71**(10): 3505-3515.
- Pallier, A., S. Hillion, R. Danger, M. Giral, M. Racape, N. Degauque, E. Dugast, J. Ashton-Chess, S. Pettre, J. J. Lozano, R. Bataille, A. Devys, A. Cesbron-Gautier, C. Braudeau, C. Larrose, J. P. Souillou and S. Brouard (2010). "Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype." *Kidney Int* **78**(5): 503-513.
- Pallotta, M. T., C. Orabona, C. Volpi, C. Vacca, M. L. Belladonna, R. Bianchi, G. Servillo, C. Brunacci, M. Calvitti, S. Biciato, E. M. Mazza, L. Boon, F. Grassi, M. C. Fioretti, F. Fallarino, P. Puccetti and U. Grohmann (2011). "Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells." *Nat Immunol* **12**(9): 870-878.
- Parekh, V. V., D. V. Prasad, P. P. Banerjee, B. N. Joshi, A. Kumar and G. C. Mishra (2003). "B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1." *J Immunol* **170**(12): 5897-5911.
- Pascual, V., Y. J. Liu, A. Magalski, O. de Bouteiller, J. Banchereau and J. D. Capra (1994). "Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil." *J Exp Med* **180**(1): 329-339.
- Perez-Andres, M., B. Paiva, W. G. Nieto, A. Caraux, A. Schmitz, J. Almeida, R. F. Vogt, Jr., G. E. Marti, A. C. Rawstron, M. C. Van Zelm, J. J. Van Dongen, H. E. Johnsen, B. Klein, A. Orfao and M. B. L. Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of (2010). "Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic." *Cytometry B Clin Cytom* **78 Suppl 1**: S47-60.
- Ray, A., S. Basu, C. B. Williams, N. H. Salzman and B. N. Dittel (2012). "A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand." *J Immunol* **188**(7): 3188-3198.
- Regateiro, F. S., D. Howie, S. P. Cobbold and H. Waldmann (2011). "TGF-beta in transplantation tolerance." *Curr Opin Immunol* **23**(5): 660-669.
- Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula and M. K. Levings (2001). "Type 1 T regulatory cells." *Immunol Rev* **182**: 68-79.
- Rowe, V., T. Banovic, K. P. MacDonald, R. Kuns, A. L. Don, E. S. Morris, A. C. Burman, H. M. Bofinger, A. D. Clouston and G. R. Hill (2006). "Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation." *Blood* **108**(7): 2485-2492.
- Sagoo, P., E. Perucha, B. Sawitzki, S. Tomiuk, D. A. Stephens, P. Miqueu, S. Chapman, L. Craciun, R. Sergeant, S. Brouard, F. Rovis, E. Jimenez, A. Ballow, M. Giral, I. Rebollo-Mesa, A. Le Moine, C. Braudeau, R. Hilton, B. Gerstmayr, K. Bourcier, A. Sharif, M. Krajewska, G. M. Lord, I. Roberts, M. Goldman, K. J. Wood, K. Newell, V. Seyfert-Margolis, A. N. Warrens, U. Janssen, H. D. Volk, J. P. Souillou, M. P. Hernandez-Fuentes and R. I. Lechler (2010). "Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans." *J Clin Invest* **120**(6): 1848-1861.
- Samstein, B. (2007). "Choosing between immunity and tolerance after transplantation." *Cell Immunol* **248**(1): 44-47.



- Sarwal, M., M. S. Chua, N. Kambham, S. C. Hsieh, T. Satterwhite, M. Masek and O. Salvatierra, Jr. (2003). "Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling." *N Engl J Med* **349**(2): 125-138.
- Schultz, K. R., J. P. Klarinet, R. S. Gieni, K. T. HayGlass and P. D. Greenberg (1990). "The role of B cells for in vivo T cell responses to a Friend virus-induced leukemia." *Science* **249**(4971): 921-923.
- Shlomchik, M. J. and F. Weisel (2012). "Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells." *Immunol Rev* **247**(1): 52-63.
- Silva, H. M., M. C. Takenaka, P. M. Moraes-Vieira, S. M. Monteiro, M. O. Hernandez, W. Chaara, A. Six, F. Agena, P. Sesterheim, F. M. Barbe-Tuana, D. Saitovitch, F. Lemos, J. Kalil and V. Coelho (2012). "Preserving the B cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation." *Mol Med*.
- Sims, G. P., R. Ettinger, Y. Shirota, C. H. Yarboro, G. G. Illei and P. E. Lipsky (2005). "Identification and characterization of circulating human transitional B cells." *Blood* **105**(11): 4390-4398.
- Singh, A., W. F. t. Carson, E. R. Secor, Jr., L. A. Guernsey, R. A. Flavell, R. B. Clark, R. S. Thrall and C. M. Schramm (2008). "Regulatory role of B cells in a murine model of allergic airway disease." *J Immunol* **180**(11): 7318-7326.
- Skok, J., J. Poudrier and D. Gray (1999). "Dendritic cell-derived IL-12 promotes B cell induction of Th2 differentiation: a feedback regulation of Th1 development." *J Immunol* **163**(8): 4284-4291.
- Solez, K., R. A. Axelsen, H. Benediktsson, J. F. Burdick, A. H. Cohen, R. B. Colvin, B. P. Croker, D. Droz, M. S. Dunnill, P. F. Halloran and et al. (1993). "International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology." *Kidney Int* **44**(2): 411-422.
- Solez, K., R. B. Colvin, L. C. Racusen, B. Sis, P. F. Halloran, P. E. Birk, P. M. Campbell, M. Cascalho, A. B. Collins, A. J. Demetris, C. B. Drachenberg, I. W. Gibson, P. C. Grimm, M. Haas, E. Lerut, H. Liapis, R. B. Mannon, P. B. Marcus, M. Mengel, M. J. Mihatsch, B. J. Nankivell, V. Nickleit, J. C. Papadimitriou, J. L. Platt, P. Randhawa, I. Roberts, L. Salinas-Madruga, D. R. Salomon, D. Seron, M. Sheaff and J. J. Weening (2007). "Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN')." *Am J Transplant* **7**(3): 518-526.
- Starzl, T. E., T. L. Marchioro, J. H. Holmes, G. Hermann, R. S. Brittain, O. H. Stonington, D. W. Talmage and W. R. Waddell (1964). "Renal Homografts in Patients with Major Donor-Recipient Blood Group Incompatibilities." *Surgery* **55**: 195-200.
- Sucher, R., K. Fischler, R. Oberhuber, I. Kronberger, C. Margreiter, R. Ollinger, S. Schneeberger, D. Fuchs, E. R. Werner, K. Watschinger, B. Zelger, G. Tellides, N. Pilat, J. Pratschke, R. Margreiter, T. Wekerle and G. Brandacher (2012). "IDO and regulatory T cell support are critical for cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4 Ig-mediated long-term solid organ allograft survival." *J Immunol* **188**(1): 37-46.
- Sugimoto, K., A. Ogawa, Y. Shimomura, K. Nagahama, A. Mizoguchi and A. K. Bhan (2007). "Inducible IL-12-producing B cells regulate Th2-mediated intestinal inflammation." *Gastroenterology* **133**(1): 124-136.
- Suryani, S., D. A. Fulcher, B. Santner-Nanan, R. Nanan, M. Wong, P. J. Shaw, J. Gibson, A. Williams and S. G. Tangye (2010). "Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells." *Blood* **115**(3): 519-529.
- Terasaki, P. I., M. Ozawa and R. Castro (2007). "Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival." *Am J Transplant* **7**(2): 408-415.
- Thaunat, O. (2011). "Pathophysiologic significance of B-cell clusters in chronically rejected grafts." *Transplantation* **92**(2): 121-126.
- Thaunat, O. (2012). "Humoral immunity in chronic allograft rejection: puzzle pieces come together." *Transl Immunol* **26**(2-3): 101-106.
- Thaunat, O., S. Graff-Dubois, S. Brouard, C. Gautreau, A. Varthaman, N. Fabien, A. C. Field, L. Louedec, J. Dai, E. Joly, E. Morelon, J. P. Soulillou, J. B. Michel and A. Nicoletti (2010). "Immune responses elicited in tertiary lymphoid tissues display distinctive features." *PLoS One* **5**(6): e11398.

- Thaunat, O., N. Patey, G. Caligiuri, C. Gautreau, M. Mamani-Matsuda, Y. Mekki, M. C. Dieu-Nosjean, G. Eberl, R. Ecochard, J. B. Michel, S. Graff-Dubois and A. Nicoletti (2010). "Chronic rejection triggers the development of an aggressive intra-graft immune response through recapitulation of lymphoid organogenesis." *J Immunol* **185**(1): 717-728.
- Thaunat, O., N. Patey, C. Gautreau, S. Lechaton, V. Fremeaux-Bacchi, M. C. Dieu-Nosjean, E. Cassuto-Viguier, C. Legendre, M. Delahousse, P. Lang, J. B. Michel and A. Nicoletti (2008). "B cell survival in intra-graft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy." *Transplantation* **85**(11): 1648-1653.
- Tian, J., D. Zekzer, L. Hanssen, Y. Lu, A. Olcott and D. L. Kaufman (2001). "Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice." *J Immunol* **167**(2): 1081-1089.
- Trapani, J. A. and V. R. Sutton (2003). "Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions." *Curr Opin Immunol* **15**(5): 533-543.
- Tretter, T., R. K. Venigalla, V. Eckstein, R. Saffrich, S. Sertel, A. D. Ho and H. M. Lorenz (2008). "Induction of CD4+ T-cell anergy and apoptosis by activated human B cells." *Blood* **112**(12): 4555-4564.
- Tu, W., Y. L. Lau, J. Zheng, Y. Liu, P. L. Chan, H. Mao, K. Dionis, P. Schneider and D. B. Lewis (2008). "Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells." *Blood* **112**(6): 2554-2562.
- Tussiwand, R., M. Rauch, L. A. Fluck and A. G. Rolink (2012). "BAFF-R expression correlates with positive selection of immature B cells." *Eur J Immunol* **42**(1): 206-216.
- Tyden, G., H. Genberg, J. Tollemar, H. Ekberg, N. H. Persson, G. Tufveson, J. Wadstrom, M. Gabel and L. Mjornstedt (2009). "A randomized, doubleblind, placebo-controlled, study of single-dose rituximab as induction in renal transplantation." *Transplantation* **87**(9): 1325-1329.
- Ueno, T., A. Habicht, M. R. Clarkson, M. J. Albin, K. Yamaura, O. Boenisch, J. Popoola, Y. Wang, H. Yagita, H. Akiba, M. J. Ansari, J. Yang, L. A. Turka, D. M. Rothstein, R. F. Padera, N. Najafian and M. H. Sayegh (2008). "The emerging role of T cell Ig mucin 1 in alloimmune responses in an experimental mouse transplant model." *J Clin Invest* **118**(2): 742-751.
- Umetsu, S. E., W. L. Lee, J. J. McIntire, L. Downey, B. Sanjanwala, O. Akbari, G. J. Berry, H. Nagumo, G. J. Freeman, D. T. Umetsu and R. H. DeKruyff (2005). "TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance." *Nat Immunol* **6**(5): 447-454.
- van de Berg, P. J., E. C. Hoevenaars, S. L. Yong, K. A. van Donselaar-van der Pant, A. van Tellingen, S. Florquin, R. A. van Lier, F. J. Bemelman and I. J. ten Berge (2012). "Circulating lymphocyte subsets in different clinical situations after renal transplantation." *Immunology* **136**(2): 198-207.
- Van Kooten, C., J. G. Boonstra, M. E. Paape, F. Fossiez, J. Banchereau, S. Lebecque, J. A. Bruijn, J. W. De Fijter, L. A. Van Es and M. R. Daha (1998). "Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection." *J Am Soc Nephrol* **9**(8): 1526-1534.
- Veronese, F., S. Rotman, R. N. Smith, T. D. Pelle, M. L. Farrell, T. Kawai, A. Benedict Cosimi and R. B. Colvin (2007). "Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection." *Am J Transplant* **7**(4): 914-922.
- Vo, A. A., A. Peng, M. Toyoda, J. Kahwaji, K. Cao, C. H. Lai, N. L. Reinsmoen, R. Villicana and S. C. Jordan (2010). "Use of intravenous immune globulin and rituximab for desensitization of highly HLA-sensitized patients awaiting kidney transplantation." *Transplantation* **89**(9): 1095-1102.
- Wardemann, H., J. Hammersen and M. C. Nussenzweig (2004). "Human autoantibody silencing by immunoglobulin light chains." *J Exp Med* **200**(2): 191-199.
- Wardemann, H., S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre and M. C. Nussenzweig (2003). "Predominant autoantibody production by early human B cell precursors." *Science* **301**(5638): 1374-1377.
- Watanabe, R., M. Fujimoto, N. Ishiura, Y. Kuwano, H. Nakashima, N. Yazawa, H. Okochi, S. Sato, T. F. Tedder and K. Tamaki (2007). "CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity." *Am J Pathol* **171**(2): 560-570.

- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." *Immunol Rev* **182**: 207-214.
- Weller, S., M. C. Braun, B. K. Tan, A. Rosenwald, C. Cordier, M. E. Conley, A. Plebani, D. S. Kumararatne, D. Bonnet, O. Tournilhac, G. Tchernia, B. Steiniger, L. M. Staudt, J. L. Casanova, C. A. Reynaud and J. C. Weill (2004). "Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire." *Blood* **104**(12): 3647-3654.
- Williams, G. M., D. M. Hume, R. P. Hudson, Jr., P. J. Morris, K. Kano and F. Milgrom (1968). ""Hyperacute" renal-homograft rejection in man." *N Engl J Med* **279**(12): 611-618.
- Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman and R. de Waal Malefyt (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." *Nat Immunol* **8**(9): 950-957.
- Woiciechowsky, C., K. Asadullah, D. Nestler, B. Eberhardt, C. Platzer, B. Schoning, F. Glockner, W. R. Lanksch, H. D. Volk and W. D. Docke (1998). "Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury." *Nat Med* **4**(7): 808-813.
- Wolf, S. D., B. N. Dittel, F. Hardardottir and C. A. Janeway, Jr. (1996). "Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice." *J Exp Med* **184**(6): 2271-2278.
- Wong, S. H., J. L. Barlow, S. Nabarro, P. G. Fallon and A. N. McKenzie (2010). "Tim-1 is induced on germinal centre B cells through B-cell receptor signalling but is not essential for the germinal centre response." *Immunology* **131**(1): 77-88.
- Wu, G., Y. M. Peng, F. Y. Liu, D. Xu and C. Liu (2013). "The role of memory B cell in tonsil and peripheral blood in the clinical progression of IgA Nephropathy." *Hum Immunol*.
- Xiao, S., C. R. Brooks, C. Zhu, C. Wu, J. M. Sweere, S. Petecka, A. Yeste, F. J. Quintana, T. Ichimura, R. A. Sobel, J. V. Bonventre and V. K. Kuchroo (2012). "Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(30): 12105-12110.
- Yoshida, T., H. Mei, T. Dorner, F. Hiepe, A. Radbruch, S. Fillatreau and B. F. Hoyer (2010). "Memory B and memory plasma cells." *Immunol Rev* **237**(1): 117-139.
- Yoshizaki, A., T. Miyagaki, D. J. DiLillo, T. Matsushita, M. Horikawa, E. I. Kountikov, R. Spolski, J. C. Poe, W. J. Leonard and T. F. Tedder (2012). "Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions." *Nature* **491**(7423): 264-268.
- Youinou, P. (2007). "B cell conducts the lymphocyte orchestra." *J Autoimmun* **28**(2-3): 143-151.
- Youinou, P., T. E. Taher, J. O. Pers, R. A. Mageed and Y. Renaudineau (2009). "B lymphocyte cytokines and rheumatic autoimmune disease." *Arthritis Rheum* **60**(7): 1873-1880.
- Yu, G., H. Dai, J. Chen, L. Duan, M. Gong, L. Liu, P. Xiong, C. Y. Wang, M. Fang and F. Gong (2008). "Gene delivery of indoleamine 2,3-dioxygenase prolongs cardiac allograft survival by shaping the types of T-cell responses." *J Gene Med* **10**(7): 754-761.
- Yu, G., M. Fang, M. Gong, L. Liu, J. Zhong, W. Feng, P. Xiong, C. Y. Wang and F. Gong (2008). "Steady state dendritic cells with forced IDO expression induce skin allograft tolerance by upregulation of regulatory T cells." *Transpl Immunol* **18**(3): 208-219.
- Yuan, X., M. J. Ansari, F. D'Addio, J. Paez-Cortez, I. Schmitt, M. Donnarumma, O. Boenisch, X. Zhao, J. Popoola, M. R. Clarkson, H. Yagita, H. Akiba, G. J. Freeman, J. Iacomini, L. A. Turka, L. H. Glimcher and M. H. Sayegh (2009). "Targeting Tim-1 to overcome resistance to transplantation tolerance mediated by CD8 T17 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(26): 10734-10739.
- Zarkhin, V., G. Chalasani and M. M. Sarwal (2010). "The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance." *Transplant Rev (Orlando)* **24**(2): 67-78.
- Zarkhin, V., N. Kambham, L. Li, S. Kwok, S. C. Hsieh, O. Salvatierra and M. M. Sarwal (2008). "Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection." *Kidney Int* **74**(5): 664-673.
- Zha, B., L. Wang, X. Liu, J. Liu, Z. Chen, J. Xu, L. Sheng, Y. Li and Y. Chu (2012). "Decrease in proportion of CD19+ CD24(hi) CD27+ B cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease." *PLoS One* **7**(11): e49835.

# ANNEXES

**ARTICLE N°1: Regulatory B cells:  
an exciting target for future  
therapeutics in transplantation.**

*Soumis à Frontiers in Alloimmunity and  
Transplantation, 2013*

# **REGULATORY B CELLS: AN EXCITING TARGET FOR FUTURE THERAPEUTICS IN TRANSPLANTATION**

**Running title: Breg in transplantation**

**Alexandre Nouël,<sup>a</sup> Christophe Jamin,<sup>a,b</sup> Jacques-Olivier Pers,<sup>a,b</sup>  
Sophie Hillion,<sup>\*a,b</sup>**

<sup>a</sup>EA2216 "Immunologie, Pathologie et Immunothérapie", Université de Brest, Université Européenne de Bretagne, SFR ScinBios, LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Brest, France

<sup>b</sup>Laboratoire d'immunologie, CHRU Morvan, Brest, France

Word count: 4279

\*Corresponding author: Sophie Hillion, EA2216 "Immunologie, Pathologie et Immunothérapie", CHRU Morvan, BP824, F-29609, Brest, France. Phone: +332-98-22-33-84 ; Fax: +332-98-22-38-47 ; [sophie.hillion@univ-brest.fr](mailto:sophie.hillion@univ-brest.fr)

## **Abstract**

Transplantation is the preferred treatment for most end-stage solid organ diseases. Despite potent immunosuppressive agents, chronic rejection remains a real problem for transplantation. For many years, the predominant immunological focus of research into transplant rejection has been T cells. The pillar of immunotherapy in clinical practice is T-cell directed, which efficiently prevents acute T-cell mediated allograft rejection. However, the main origin of late allograft failure is chronic rejection and the humoral arm of the immune response now emerges as an important factor in transplantation. Thus, the potential effects of antibodies and B cell infiltrates on transplants set the B cells as major actors in late graft rejection. Consequently, a number of recent drugs target either B cells or plasma cells. However, immunotherapy such as the anti-CD20 B cell-depleting antibody can generate deleterious effect on the transplant. The contribution of regulatory B (Breg) cells or B10 cells has been reported in the case of transplantation, mainly in mice models, highlighting the primordial role that some populations of B cells can play in graft tolerance. Nevertheless, this regulatory aspect remains poorly characterized in clinical transplantation. Total B-cell depletion treatment should thus be circumvented and novel approaches are required to manipulate the different B-cell subsets. This article provides an overview of the current knowledges on the link between Breg cells and grafts, and reports a number of data advising Breg cells as a new target for future therapeutic approaches.

**Keywords:** Regulatory B cells, transplantation, immunotherapy, graft, tolerance



## **1 Dual role for B cells in transplantation**

### **1.1 B cells: the dark side**

Basic advances on transplant rejection and tolerance come from animal models and are of great importance for breakthrough in transplant immunology. Different rodent models are used to study acute and chronic rejection. For chronic rejection, the most commonly used model is a murine heart transplantation seeing that function assay and survey of heart transplant by graft pulsation are reliable (Martins 2008). Since the first mouse heart transplant prototype (Corry et al. 1973), diverse heart transplant models have been developed to help in the comprehension of mechanisms responsible for graft failure and tolerance (Bedi et al. 2010). Hence, implication of regulatory T (Treg) cells has been evidenced for long term allograft survival (Schenk et al. 2005). Moreover, the increase of CD4<sup>+</sup> IL17<sup>+</sup> T cells in T-bet deficient mice demonstrated the role of cytokines on graft injury (Yuan et al. 2008). Though a high rate of tolerance is usually observed, graft of kidney is also used to understand the mechanisms of rejection. Decrease of renal function and development of renal dysfunction are actually convenient criteria to evaluate graft failure.

Various models are used to study acute rejection. They are mainly based on two ways of allorecognition requiring activation of alloreactive CD4 T cells (Rogers and Lechler 2001). First, T cells can recognize directly non self-MHC molecules on donor antigen presenting cells (APC). In contrast, an indirect recognition consists to process and present self-MHC molecule as peptide by APC from recipient to T cells. The roles of APC allow to think that implication for B cells in these phases is not excluded. Thus, in acute cardiac allograft rejection, B cells take part into the progression of rejection by antigen presentation to T cells (Noorchashm et al. 2006). Costimulatory molecules play a major role in this allorecognition. Inducible costimulatory (ICOS) molecule, constitutively expressed on B cells, interacts with the B7h molecules on T cells and induces activation and expansion of alloreactive T cells *in vitro* (Du et al.



2011). Alloantibodies are another important B cell-dependent component in acute rejection as well as humoral rejection by promoting allospecific T cell priming. Through the generation of opsonized donor cells, they enhance T cell activation and ultimately facilitate cellular rejection (Burns and Chong 2011).

Nowadays, advances on transplant rejection in animal models are hardly substitutable in humans. With respect to both acute cellular and humoral rejection, the two main forms of rejection, research of clinical studies focuses on identification of specific biomarkers for rejection or tolerance. It should be noted that with the development of potent effective drugs, acute rejection tends to disappear. Consequently, most of the studies concentrate to chronic rejection. Yet, mortality of transplant cells inducing graft failure in acute rejection is mainly mediated by T cells but involvement of B cells is suspected. B cells have thus been observed in the renal graft infiltrates suggesting that they may be important contributors of the rejection process in acute renal allograft rejection (Sarwal et al. 2003; Zarkhin et al. 2008). Moreover, the presence of CD20<sup>+</sup> infiltrated B cells has been associated with poor prognostic of transplant in acute cellular rejection of renal allograft (Hippen et al. 2005).

Furthermore, participation of B cells is now highlighted in chronic rejection which is the major barrier to long term allograft survival (Kwun and Knechtle 2009). First, alloantibody production is demonstrated in renal transplantation (Worthington et al. 2003), and germinal centers formation have been found in chronically rejected human heart and kidney, supporting the development of a humoral local immune response (Thaunat et al. 2005). In cardiac allograft rejection, infiltration of B cells is also correlated with a higher risk of chronicity of rejection (Sorrentino et al. 2006). All together, these works report convincing data suggesting that B cells likely can play pathogenic roles in graft rejection.

## 1.2 B cells: the light side

Considering the overall immunosuppressive function of regulatory B (Breg) cells (Mauri 2010), it is conceivable that they could play a critical role also for graft tolerance in transplantation. Experiments with rodent models indicate an accumulation of B cells in tolerant allograft and the formation of germinal centers in transplants with an inhibitory profile (Le Texier et al. 2011). In human, percentages of B cells are increased in transplant tolerant patients but not in immunosuppressive treated patients, suggesting that B cells can play a preponderant role in tolerance (Li et al. 2004). Furthermore, an increased frequency of the IL-10<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD38<sup>high</sup> immature regulatory B cells has been observed in tolerant renal recipients who did not require immunosuppressive treatment (Newell et al. 2010). Likewise, a large number of regulatory CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> CD1d<sup>+</sup> B cells has been observed in peripheral blood of patients with long-term kidney graft function (Pallier et al. 2010). Moreover, in tolerant patients, these B cells conserved a high capacity to activate the CD40/STAT3 signaling pathway that promotes high level of IL10 secretion (Silva et al. 2012) likely involved in their regulatory activity (Blair et al. 2010). Consistent with these observations, we have recently demonstrated an abnormal distribution of B cells associated with impaired regulatory capacities in patients with chronic antibody mediated rejection after kidney transplantation (Nouël et al. 2013). These results indicate that tolerant patients exhibit B cells with inhibitory profile, and that some B-cell subsets could play a central role in the survey of the transplant although their role and the way they operate remain unclear.

## 2 Regulatory B cells in transplantation

### 2.1 Phenotype

Historically, B cells have been characterized as positive regulators of humoral immune responses, but evidences of B-cell negative activity have accumulated since their first description in the early 1970s (Katz et al. 1974). The main negative regulatory functions of B cells have been described in mouse

models of autoimmunity such as collagen-induced arthritis, chronic inflammation, bowel disease, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), and are especially based on their striking ability to produce IL-10 (Fillatreau et al. 2002). These Breg cells have thus been called B10 cells (Yanaba et al. 2008). Numerous studies report contradictory phenotypes of this B-cell subset and various B10 phenotypes have been described in mice. It has been initially demonstrated that B cells expressing high level of CD1d in response to inflammation in a colitis model is able to produce IL-10 and is responsible for the down-regulation of the inflammatory response (Mizoguchi et al. 2002). The B10 cells can be further characterized as a rare population of CD19<sup>high</sup> CD5<sup>+</sup> CD1d<sup>high</sup> B cells able to regulate inflammatory response through IL-10 secretion in a model of contact hypersensitivity (Yanaba et al. 2008). In addition, the production of IL-10 can be attributed to CD19<sup>+</sup> CD21<sup>high</sup> CD23<sup>high</sup> IgM<sup>high</sup> B cells in experimental arthritis which is a phenotype similar to transitional type 2 B cells that suppress arthritis development (Evans et al. 2007). Heterogeneity in phenotypic analyses proves that identification of common markers of Breg cells must be found for a complete characterization of this specific population. A novel unexpected marker has been recently described. Ding and colleagues showed that the costimulatory molecule TIM-1 known as a modulator of effector CD4<sup>+</sup> T cell differentiation is predominantly expressed on IL-10-secreting B cells (Ding et al. 2011). B10 cells can be induced by TIM-1 ligation which enhances IL-10 production to play an important functional role in tolerance maintenance. Whether human Breg cells also express TIM-1 has still to be determined.

Description of negative regulatory B cell subset has been also recently evoked in human. Yet, the diversity of the results does not allow to disclose a consensual model for their characterization. However, it seems that human Breg cells can be described as CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> immature B cells. They secrete high level of IL-10, which is equivalent to transitional B cells in mice (Sims et al. 2005). Interestingly, this population displays regulatory capacity in healthy volunteers manifested by suppression of T helper 1 (TH1) cell

differentiation that appears deficient in systemic lupus erythematosus patients (Blair et al. 2010; Lemoine et al. 2011). Such defective function of Breg cells could take part into the severity of autoimmune disorders (Jamin et al. 2008).

## 2.2 Mechanism of action

The function of B10 cells in autoimmunity is more and more acknowledged. The first evidence appeared in 1996 in EAE. Wolf et al. demonstrated that B10 cells have an incidence in the immune regulation of the course of the disease and contribute to spontaneous recovery (Wolf et al. 1996). It has been further shown that they can play a negative regulatory role also during immune responses, inflammations and infections decreasing the severity of the pathologies (Bouaziz et al. 2008; DiLillo et al. 2010). Their regulatory effect occurs mainly by inhibition of TH1 cells (Matsushita et al. 2008). B10 cells may also negatively regulate inflammation by generating CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> regulatory T (Tr1) cells and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T (nTreg) cells (Gray et al. 2007). They participate in the maintenance of the Treg pool due to expression of GITRL, which is essential for the Treg homeostasis (Ray et al. 2012). However, many B cells can be activated to produce IL-10 and to acquire regulatory capacity. Engagement of CD40 known to be the main stimulus for B10 activation seems to be a prerequisite. Thus in EAE, CD40 activation of antigen specific B cells leads to disease recovery by provision of IL-10 (Fillatreau et al. 2002), while in arthritis, B cells stimulated with agonistic anti-CD40 monoclonal antibody in the presence of specific antigen can induce the differentiation of efficient Breg cells (Mauri et al. 2003). A second important signaling required for the induction of B10 cells is the Toll-like receptor (TLR) pathway. Activation of B cells with CpG-ODN, a ligand for TLR9, enhances differentiation and proliferation of B10 cells *in vitro*. Furthermore, stimulation of TLR9 on B cells from lupus mice by CpG injection increases IL-10 secretion (Brummel and Lenert 2005).

In human, knowledge for B10 activation is hardly described. Engagement of CD40 pathway leads preferentially to the production of IL-10. Interestingly, human activated T cells can activate B cells following CD40L/CD40 interaction and develop their regulatory functions highlighted by the suppressive effect of B cells on the T-cell proliferation and by the generation of Treg cells (Lemoine et al. 2011). High level of IL-10 secretion is also responsible for the control of TH1 differentiation (Blair et al. 2010). Notably, co-stimulation of B cells with both CD40L and CpG can potentiate the production of IL-10 and hence facilitate the regulatory capacities of the B cells (Iwata et al. 2011; Lemoine et al. 2011). Studies have incriminated IL-10-producing B cells in the development of autoimmune diseases (Amel Kashipaz et al. 2003; Diaz-Alderete et al. 2004). However, the recent advances in IL-10 and B cells producing this anti-inflammatory cytokine now suggest that human B10-like cells might have beneficial effects when regulating the autoimmune responses.

### 2.3 Immunosuppression is not only IL-10 dependent

Regulatory B cell activities are much more diverse and can be attributed to IL-10-independent mechanisms. Granzyme B, an enzymatic component of the cytotoxic granules, can be produced by B cells. It mediates cleavage of caspases and initiates apoptosis of human infected cells (Trapani and Sutton 2003). Expression of death-inducing ligands is another B cell-dependent regulatory mechanism. Thus, Fas ligand (FasL) and tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) expressed on mouse and human B cells are able to activate programmed cell death in target cells following ligation with their cell surface receptor (Lundy 2009). Programmed death ligand 1 and 2 (PD-L1 and PD-L2) have also been reported to be expressed by B cells. They can participate in the B-cell immune active suppression. All this data demonstrate that direct cellular contact without soluble factor is an important component for Breg cell activity. Moreover, in mouse EAE model, B cell can regulate CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cell expansion via B7 expression resulting in suppression of autoimmune inflammation and recovery (Mann et al. 2007). It seems that human Breg cells

have similar faculty to expand CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg cells contributing to the regulation of TH1 immune response (Lemoine et al. 2011).

Furthermore, B cells have been described to secrete natural antibodies with immunosuppressive function in normal and pathological situations. These antibodies can bind to the surface of apoptotic cells. Phagocytosis efficiency by macrophages and dendritic cells are thus increased (Chen et al. 2009). Moreover, these antibodies are able to negatively regulate the inflammatory capacity of APC, due to inhibition of dendritic cells maturation and down-regulation of molecules involved in antigen presentation (Chen et al. 2009).

Besides IL-10 secretion, other B cell-secreted soluble factors support the regulatory mechanism. For example, production of TGFβ may lead to induction of Foxp3<sup>+</sup> Treg cells, and thereby contributes to exert immune suppressive function. *In vitro* experiments using a murine model of allergic airway disease, demonstrated that TGFβ secreted by B cells induced conversion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> effector T cells into CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg cells (Singh et al. 2008). Whether human B cells can secrete TGFβ contributing to Breg efficiency is still unclear.

Overall, immunosuppressive actions of regulatory B cells appear complex (Lemoine et al. 2009) and can not be confined only to secretion of IL-10, but rather result from combined mechanism that associate different cytokines and different cell-to-cell contacts.

### **3 CD5 and Breg cells**

#### **3.1 Basic notions on CD5**

The CD5 molecule has been discovered 30 years ago, described firstly as a pan-T cell marker and expressed on B cells from chronic lymphocytic leukemia (Boumsell et al. 1980). Initially considered as a costimulatory molecule, studies in mice have shown that CD5 could play inhibitory role on TCR and BCR signalings on normal T and B cells, respectively (Tarakhovsky et al. 1995; Gary-Gouy et al. 2002). The CD5 positive B cell population represents 1-2% of splenic

B cells and 7-8% of peritoneal B cells in mice but 5-30% of human peripheral blood and 10% of human spleen B cells (Youinou et al. 1999; Carsetti et al. 2004). Re-called B1 cells, human CD5<sup>+</sup> B cells can be differentiated from conventional CD5<sup>-</sup> B2 cells by their phenotype IgM<sup>high</sup>, IgD<sup>low</sup>, CD72<sup>high</sup> and CD45RA<sup>+</sup> (Jamin et al. 1993). Recently, another rare human B-cell subset with regulatory function has been described which express CD5 in association with a phenotype similar to the murine B1a and marginal zone B cells (Bouaziz et al. 2010; Iwata et al. 2011). While most of the studies seem to agree on the fact that CD5 can be considered as a main marker of regulatory B cells in mice, at least for B10 cells, the same does not hold true in human. Thus, B cells without CD5 expression can display efficient regulatory function modulating dendritic cell maturation (Morva et al. 2012). Phenotypic identification of Breg cells, even B10 cells, based only on CD5 expression can not be satisfactory, and functional characterizations are still required.

### 3.2 CD5 as marker of Breg

All these data strongly suggest that discrimination of the Breg population based on one unique phenotype is doubtful. Moreover, it is reasonable to hypothesize that any B cells can potentially develop regulatory function when activated in the appropriated microenvironment. However, CD5 molecule among other appears to be one, although not exclusive, distinctive marker indicating B cells with high regulatory capacities, and as such could be considered as the hallmark of Breg cells in human and in mice. CD5 positive B cells are known as the primary population able to secrete high level of IL-10 (O'Garra et al. 1992) which can explain their high regulatory potential (Sun et al. 2005). This CD5 molecule is able to act as a negative regulator of BCR signaling (Dalloul 2009) and is also described as an inhibitory receptor by recruitment of the negative regulators SHP-1, Ras-GAP, c-Cbl and CK2 (Dennehy et al. 1998; Axtell et al. 2006; Demydenko 2010). Furthermore, expression of CD5 is also associated with B-cell survival, especially in B-cell lymphocytic leukemia by a PKC-dependent mechanism (Perez-Chacon et al. 2007). Interestingly, CD5<sup>+</sup> B cells are



characterized by co-expression of molecules involved in peripheral tolerance. They express high level of FasL in mice conferring important function in autoimmunity with potent therapeutic role, and high level of the immune regulator PD-L2. They produce the granzyme B to mediate cleavage of caspases and initiate apoptosis of infected cells in human (Trapani and Sutton 2003). From a regulatory aspect, CD5<sup>+</sup> B cells inhibit more efficiently the T-cell proliferative response than the CD5<sup>-</sup> B cells (Lemoine et al. 2011). This specificity can be partly explained by high transcriptional activity of IL-10 which is mediated by the transcription factors STAT1, STAT3 and NFAT2 (Garaud et al. 2011). Considering all these recent descriptions, a rare sub-population of B cells expressing CD5 can be pointed out which use multiple immunosuppressive mechanisms and contribute to peripheral tolerance (Klinker and Lundy 2012). This CD5<sup>+</sup> Breg subset constitutes an exciting target for future therapeutics based on expansion of its regulatory functions.

#### **4 B-cell-based therapeutics**

Various drugs targeting T cells are currently and efficiently used to prevent acute rejection in transplantation. However, efficacy of treatments is less convincing in chronic rejection. A large number of therapeutic options that modify the B cell responses are developed to induce tolerance. The useful approach consists in the depletion of B cells to reduce their possible contribution in alloimmune responses. Numerous cytotoxic antibodies binding to antigen expressed on B-cell surface are available. For example, the anti-CD52 monoclonal antibody Alemtuzumab is well known to prevent acute rejection by depleting T cells and B cells, though it increases incidence of humoral rejection in chronic rejection (Willicombe et al. 2011). Rituximab is a humanized monoclonal antibody directed to the pan B-cell surface molecule CD20. It is the most commonly used immunotherapy in autoimmunity. It has been shown in some studies that rituximab could prevent emergence of alloantibody-producing cells and eliminate short-lived plasma cells, and thereby prove to be clinically effective in the treatment of acute rejection (Clatworthy 2011). Recently,



increased levels of BAFF in transplant rejection have been demonstrated suggesting a distinct way for therapeutics in transplantation. Thus, blockade of BAFF- and APRIL-dependent stimulation of B cells using Atacicept (a recombinant TACI-Ig fusion protein) or Belimumab (a human anti-BAFF monoclonal antibody) could be promising. Indeed, Atacicept can prevent B-cell maturation, differentiation and survival while Belimumab can bind and inhibit soluble BAFF (Kwun et al. 2012).

Notwithstanding a growing number of drugs used in transplantation, humoral rejection is still a recurrent problem mainly because the precise role of B cells remains to be clearly deciphered. This is the only way before being able to develop efficient drug for the prevention of humoral chronic rejection. One of the main problems relies in the ability to discriminate "good" and "bad" B cells. Obviously, B-cell depletion treatment will have an impact on pathogenic but also normal B cells and regulatory B cells. Consistent with this idea, elimination of B cells with anti-CD20 antibody in mice has two contrasting consequences on EAE progression depending on the time course for B cell depletion. Depletion of B cells before EAE induction exacerbates the severity of the pathology whereas depletion during the acute phase of the disease decreases the symptoms (Matsushita et al. 2008). Such striking discrepancy is due to the fact that early B cell depletion before EAE induction eliminates the Breg cell population, and thus their suppressive role on the disease. In contrast, depletion of B cells during the progression of the disease mainly affects the effector B cells, which prevents activation of CD4<sup>+</sup> T cells resulting in down regulation of the disease severity. B cells are clearly able to play two distinct roles in one pathology. The balance between effector B cells that promote immunity and regulatory B cells with potent immunosuppressive role, is a key factor in the microenvironment (Kurosaki 2008). It becomes evident to considerate not only the time course of the therapy but also the identification of the relative contribution of each B-cell subset in the evolution of the disease for the development of adapted therapeutic

strategies. This is especially important in transplantations where B cell depletion can lead to damaging effects on the transplant (Barnett et al. 2011)

## **5 Perspectives in transplantation**

B cells are crucial regulators of immunity and their aptitude to generate and maintain tolerance should be exploited for future immunotherapeutic advances in transplantation. Several studies have analyzed the phenotype of circulating T lymphocyte subsets before and after transplantation to evaluate the immunosuppressive effect of conventional treatments. Although reduction of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and increase of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg cells have been described, there are still conflicting data. Thus, the percentage of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> circulatory Treg population is decreasing during years after transplantation despite continuation of immunosuppressive treatment. Informations related to B cells are scarce. A decrease of circulating B-cell count after transplantation has been elicited, but the effect of this depletion on graft survival remains unclear (van de Berg et al. 2012). However, it is likely that changes in lymphocyte subsets might contribute to rejection. To this end, analyses of B-cell subsets distribution for an overview of the immune reaction in case of rejection could be informative. Recent cellular analyses showed enrichment of naïve and transitional B cells but not memory B cells in the peripheral blood of tolerant patients without immunosuppressive treatment compared with immunosuppressed patients with stable graft function (Chong and Sciammas 2011). We also recently observed decreased frequencies and absolute numbers of activated and transitional B cells but an elevated frequency and absolute number of memory B cells in patients with chronic antibody mediated rejection compared to patients with stable graft function (Nouël et al. 2013). It will be of interest to know which B-cell populations are functionally defective in patients with graft rejection, and in a prospective point of view to have a rigorous follow up of these populations in transplanted patients before and after graft to develop new therapeutics. An alternative method to ameliorate tolerance in transplantation would be to modulate B-cell activation. However, prevention of

antigen-specific B-cell activation requires identification of antigen responsible for BCR stimulation. Blockade of costimulatory receptors like CD19 or CD21, or stimulation of inhibitory receptors such as CD22 could help to reach the beneficial effect through inhibition of B-cell responses. In this context, the humanized anti-CD22 monoclonal antibody, Epratuzumab, has been successfully used in systemic lupus erythematosus. It yields to the depletion of 35% of total B cells and concomitantly inhibited B-cell activation and proliferation (Dorner et al. 2006).

Induction and maintenance of tolerance based on cellular depletion or on inhibition of cellular activation appear to be the most evident B cell-dependent approaches in transplantation. However, it seems relevant now to develop new strategy to trigger expansion of the Breg population and maintain or develop immune tolerance. One possibility could be the *in vivo* generation of regulatory B cells by injection of drug inducing activation signals for Breg cell differentiation in patient during transplantation. Yet, knowledge on Breg cell development has to be further completed. An alternative procedure would be the *in vitro* generation of Breg cells, before transfer into receiver to elicit efficient regulatory function. CD40 stimulation could help to expand IL-10-secreting CD5 positive B cells, which could play an important immunosuppressive role. However, concomitant activation of effector B cells will lead to associate an ensuing treatment for the depletion of unwanted B cells.

## **Conclusion**

Diverse mechanisms are involved in graft tolerance but generation of efficient regulatory B cells is undoubtedly a major aspect. Thus, emerging roles of Breg cells, specifically in graft rejection, now arise in the current literature. Although comprehensions of animal models are more and more accurately described, translation in human is until now tricky. Many decisive questions on Breg cell biology still need to be addressed. How their development can be controlled? How their function can be induced? Nevertheless, the discovery of

Breg cells offers promising innovative therapeutic approaches, and this area is worthy of pursuit in the near future.

### **Conflict of interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### **Acknowledgements**

Alexandre Nouël was supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. Thanks is due to Simone Forest and Geneviève Michel for their secretarial assistance.

## References

- Amel Kashipaz, M.R., Huggins, M.L., Lanyon, P., Robins, A., Powell, R.J., and Todd, I. (2003). Assessment of Be1 and Be2 cells in systemic lupus erythematosus indicates elevated interleukin-10 producing CD5+ B cells. *Lupus*. 12, 356-363
- Axtell, R.C., Xu, L., Barnum, S.R., and Raman, C. (2006). CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *J. Immunol*. 177, 8542-8549
- Barnett, N., Dorling, A., and Mamode, N. (2011). B cells in renal transplantation: pathological aspects and therapeutic interventions. *Nephrol. Dial. Transplant*. 26, 767-77410.1093/ndt/gfq716.
- Bedi, D.S., Riella, L.V., Tullius, S.G., and Chandraker, A. (2010). Animal models of chronic allograft injury: contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction. *Transplantation*. 90, 935-94410.1097/TP.0b013e3181efcfbc.
- Blair, P.A., Norena, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 32, 129-14010.1016/j.immuni.2009.11.009.
- Bouaziz, J.D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., and Musette, P. (2010). IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur. J. Immunol*. 40, 2686-269110.1002/eji.201040673.
- Bouaziz, J.D., Yanaba, K., and Tedder, T.F. (2008). Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol. Rev*. 224, 201-21410.1111/j.1600-065X.2008.00661.x.
- Boumsell, L., Coppin, H., Pham, D., Raynal, B., Lemerle, J., Dausset, J., and Bernard, A. (1980). An antigen shared by a human T cell subset and B cell chronic lymphocytic leukemic cells. Distribution on normal and malignant lymphoid cells. *J. Exp. Med*. 152, 229-234

- Brummel, R., and Lenert, P. (2005). Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 174, 2429-2434
- Burns, A.M., and Chong, A.S. (2011). Alloantibodies prevent the induction of transplantation tolerance by enhancing alloreactive T cell priming. *J. Immunol.* 186, 214-22110.4049/jimmunol.1001172.
- Carsetti, R., Rosado, M.M., and Wardmann, H. (2004). Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev.* 197, 179-191
- Chen, Y., Khanna, S., Goodyear, C.S., Park, Y.B., Raz, E., Thiel, S., Gronwall, C., Vas, J., Boyle, D.L., Corr, M., Kono, D.H., and Silverman, G.J. (2009a). Regulation of dendritic cells and macrophages by an anti-apoptotic cell natural antibody that suppresses TLR responses and inhibits inflammatory arthritis. *J. Immunol.* 183, 1346-135910.4049/jimmunol.0900948.
- Chen, Y., Park, Y.B., Patel, E., and Silverman, G.J. (2009b). IgM antibodies to apoptosis-associated determinants recruit C1q and enhance dendritic cell phagocytosis of apoptotic cells. *J. Immunol.* 182, 6031-604310.4049/jimmunol.0804191.
- Chong, A.S., and Sciammas, R. (2011). Matchmaking the B-cell signature of tolerance to regulatory B cells. *Am. J. Transplant.* 11, 2555-256010.1111/j.1600-6143.2011.03773.x.
- Clatworthy, M.R. (2011). Targeting B cells and antibody in transplantation. *Am. J. Transplant.* 11, 1359-136710.1111/j.1600-6143.2011.03554.x.
- Corry, R.J., Winn, H.J., and Russell, P.S. (1973). Primarily vascularized allografts of hearts in mice. The role of H-2D, H-2K, and non-H-2 antigens in rejection. *Transplantation.* 16, 343-350
- Dalloul, A. (2009). CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmun. Rev.* 8, 349-35310.1016/j.autrev.2008.11.007.
- Demydenko, D. (2010). c-Cbl mediated ubiquitylation and regulation of cell surface exposure of CD5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 500-50410.1016/j.bbrc.2010.01.052.
- Dennehy, K.M., Broszeit, R., Ferris, W.F., and Beyers, A.D. (1998). Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5. *Eur. J. Immunol.* 28, 1617-

162510.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-7.

- Diaz-Alderete, A., Crispin, J.C., Vargas-Rojas, M.I., and Alcocer-Varela, J. (2004). IL-10 production in B cells is confined to CD154+ cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 23, 379-38310.1016/j.jaut.2004.10.001.
- Dilillo, D.J., Matsushita, T., and Tedder, T.F. (2010). B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1183, 38-5710.1111/j.1749-6632.2009.05137.x.
- Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., Chalasani, G., Sayegh, M.H., Najafian, N., and Rothstein, D.M. (2011). Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 3645-365610.1172/JCI46274.
- Dorner, T., Kaufmann, J., Wegener, W.A., Teoh, N., Goldenberg, D.M., and Burmester, G.R. (2006). Initial clinical trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) for immunotherapy of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 8, R7410.1186/ar1942.
- Du, J.F., Li, Q.Y., Ji, X.Q., Chen, G., Bai, X., Zuo, F.Y., and Yu, B. (2011). Inhibition of T-cell expansion caused by inducible costimulator/B7h costimulation blockade in direct allorecognition pathway. *Transplant. Proc.* 43, 3960-396310.1016/j.transproceed.2011.09.044.
- Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2007). Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. Immunol.* 178, 7868-7878
- Fillatreau, S., Sweeney, C.H., Mcgeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* 3, 944-95010.1038/ni833.
- Garaud, S., Morva, A., Lemoine, S., Hillion, S., Bordron, A., Pers, J.O., Berthou, C., Mageed, R.A., Renaudineau, Y., and Youinou, P. (2011). CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J. Immunol.* 186, 4835-484410.4049/jimmunol.1003050.



- Gary-Gouy, H., Harriague, J., Dalloul, A., Donnadieu, E., and Bismuth, G. (2002). CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J. Immunol.* 168, 232-239
- Gray, M., Miles, K., Salter, D., Gray, D., and Savill, J. (2007). Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14080-1408510.1073/pnas.0700326104.
- Hippen, B.E., Demattos, A., Cook, W.J., Kew, C.E., 2nd, and Gaston, R.S. (2005). Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am. J. Transplant.* 5, 2248-225210.1111/j.1600-6143.2005.01009.x.
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., Hall, R.P., St Clair, E.W., and Tedder, T.F. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 117, 530-54110.1182/blood-2010-07-294249.
- Jamin, C., Lamour, A., Pennec, Y.L., Hirn, M., Le Goff, P., and Youinou, P. (1993). Expression of CD5 and CD72 on T and B cell subsets in rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 92, 245-250
- Jamin, C., Morva, A., Lemoine, S., Daridon, C., De Mendoza, A.R., and Youinou, P. (2008). Regulatory B lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity. *Arthritis Rheum.* 58, 1900-190610.1002/art.23487.
- Katz, S.I., Parker, D., and Turk, J.L. (1974). B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature.* 251, 550-551
- Klinker, M.W., and Lundy, S.K. (2012). Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes. *Mol. Med.* 18, 123-13710.2119/molmed.2011.00333.
- Kurosaki, T. (2008). Paradox of B cell-targeted therapies. *J. Clin. Invest.* 118, 3260-326310.1172/JCI37099.
- Kwun, J., Bulut, P., Kim, E., Dar, W., Oh, B., Ruhil, R., Iwakoshi, N., and Knechtle, S.J. (2012). The role of B cells in solid organ transplantation. *Semin. Immunol.* 24, 96-10810.1016/j.smim.2011.08.022.



- Kwun, J., and Knechtle, S.J. (2009). Overcoming Chronic Rejection-Can it B? *Transplantation*. 88, 955-96110.1097/TP.0b013e3181b96646.
- Le Texier, L., Thebault, P., Lavault, A., Usal, C., Merieau, E., Quillard, T., Charreau, B., Soulillou, J.P., Cuturi, M.C., Brouard, S., and Chiffolleau, E. (2011). Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am. J. Transplant.* 11, 429-43810.1111/j.1600-6143.2010.03336.x.
- Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2009). Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1173, 260-26710.1111/j.1749-6632.2009.04651.x.
- Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2011). Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J. Autoimmun.* 36, 228-23810.1016/j.jaut.2011.01.005.
- Li, Y., Koshiba, T., Yoshizawa, A., Yonekawa, Y., Masuda, K., Ito, A., Ueda, M., Mori, T., Kawamoto, H., Tanaka, Y., Sakaguchi, S., Minato, N., Wood, K.J., and Tanaka, K. (2004). Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 4, 2118-212510.1111/j.1600-6143.2004.00611.x.
- Lundy, S.K. (2009). Killer B lymphocytes: the evidence and the potential. *Inflamm Res.* 10.1007/s00011-009-0014-x.
- Mann, M.K., Maresz, K., Shriver, L.P., Tan, Y., and Dittel, B.N. (2007). B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 178, 3447-3456
- Martins, P.N. (2008). Assessment of graft function in rodent models of heart transplantation. *Microsurgery*. 28, 565-57010.1002/micr.20544.
- Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.* 118, 3420-343010.1172/JCI36030.
- Mauri, C. (2010). Regulation of immunity and autoimmunity by B cells. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 761-76710.1016/j.coi.2010.10.009.

- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., and Londei, M. (2003). Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.* 197, 489-501
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S., and Bhan, A.K. (2002). Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*. 16, 219-230
- Morva, A., Lemoine, S., Achour, A., Pers, J.O., Youinou, P., and Jamin, C. (2012). Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. *Blood*. 119, 106-11410.1182/blood-2011-06-360768.
- Newell, K.A., Asare, A., Kirk, A.D., Gisler, T.D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W.J., Marks, W.H., Sanz, I., Lechler, R.I., Hernandez-Fuentes, M.P., Turka, L.A., and Seyfert-Margolis, V.L. (2010). Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 120, 1836-184710.1172/JCI39933.
- Noorchashm, H., Reed, A.J., Rostami, S.Y., Mozaffari, R., Zekavat, G., Koeberlein, B., Caton, A.J., and Naji, A. (2006). B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection. *J. Immunol.* 177, 7715-7722
- Nouël, A., Ségalen, I., Jamin, C., Doucet, L., Caillard, S., Renaudineau, Y., Pers, J.O., Le Meur, Y., and Hillion, S. (2013). B-cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody mediated rejection. *Kidney Int.* in press.
- O'garra, A., Chang, R., Go, N., Hastings, R., Haughton, G., and Howard, M. (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.* 22, 711-71710.1002/eji.1830220314.
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racape, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., Pettre, S., Lozano, J.J., Bataille, R., Devys, A., Cesbron-Gautier, A., Braudeau, C., Larrose, C., Souillou, J.P., and Brouard, S. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* 78, 503-51310.1038/ki.2010.162.
- Perez-Chacon, G., Vargas, J.A., Jorda, J., Morado, M., Rosado, S., Martin-Donaire, T., Losada-Fernandez, I., Rebolleda, N., and Perez-Aciego, P. (2007). CD5 provides viability signals to B cells from a subset of B-CLL patients by a mechanism that involves PKC. *Leuk. Res.* 31, 183-19310.1016/j.leukres.2006.03.021.

- Ray, A., Basu, S., Williams, C.B., Salzman, N.H., and Dittel, B.N. (2012). A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J. Immunol.* 188, 3188-319810.4049/jimmunol.1103354.
- Rogers, N.J., and Lechler, R.I. (2001). Allorecognition. *Am. J. Transplant.* 1, 97-102
- Sarwal, M., Chua, M.S., Kambham, N., Hsieh, S.C., Satterwhite, T., Masek, M., and Salvatierra, O., Jr. (2003). Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N. Engl. J. Med.* 349, 125-13810.1056/NEJMoa035588.
- Schenk, S., Kish, D.D., He, C., El-Sawy, T., Chiffoleau, E., Chen, C., Wu, Z., Sandner, S., Gorbachev, A.V., Fukamachi, K., Heeger, P.S., Sayegh, M.H., Turka, L.A., and Fairchild, R.L. (2005). Alloreactive T cell responses and acute rejection of single class II MHC-disparate heart allografts are under strict regulation by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 174, 3741-3748
- Silva, H.M., Takenaka, M.C., Moraes-Vieira, P.M., Monteiro, S.M., Hernandez, M.O., Chacara, W., Six, A., Agena, F., Sesterheim, P., Barbe-Tuana, F.M., Saitovitch, D., Lemos, F., Kalil, J., and Coelho, V. (2012). Preserving the B cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol. Med.* 10.2119/molmed.2011.00281.
- Sims, G.P., Ettinger, R., Shiota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., and Lipsky, P.E. (2005). Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood.* 105, 4390-439810.1182/blood-2004-11-4284.
- Singh, A., Carson, W.F.T., Secor, E.R., Jr., Guernsey, L.A., Flavell, R.A., Clark, R.B., Thrall, R.S., and Schramm, C.M. (2008). Regulatory role of B cells in a murine model of allergic airway disease. *J. Immunol.* 180, 7318-7326
- Sorrentino, C., Scarinci, A., D'antuono, T., Piccirilli, M., Di Nicola, M., Pasquale, M., Di Iorio, C., and Di Carlo, E. (2006). Endomyocardial infiltration by B and NK cells foreshadows the recurrence of cardiac allograft rejection. *J. Pathol.* 209, 400-41010.1002/path.1980.
- Sun, C.M., Deriaud, E., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2005). Upon TLR9 signaling, CD5<sup>+</sup> B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity.* 22, 467-47710.1016/j.immuni.2005.02.008.

- Tarakhovsky, A., Kanner, S.B., Hombach, J., Ledbetter, J.A., Muller, W., Killeen, N., and Rajewsky, K. (1995). A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science*. 269, 535-537
- Thaunat, O., Field, A.C., Dai, J., Louedec, L., Patey, N., Bloch, M.F., Mandet, C., Belair, M.F., Bruneval, P., Meilhac, O., Bellon, B., Joly, E., Michel, J.B., and Nicoletti, A. (2005). Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14723-14728.10.1073/pnas.0507223102.
- Trapani, J.A., and Sutton, V.R. (2003). Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 533-543
- Van De Berg, P.J., Hoevenaars, E.C., Yong, S.L., Van Donselaar-Van Der Pant, K.A., Van Tellingen, A., Florquin, S., Van Lier, R.A., Bemelman, F.J., and Ten Berge, I.J. (2012). Circulating lymphocyte subsets in different clinical situations after renal transplantation. *Immunology*. 136, 198-207.10.1111/j.1365-2567.2012.03570.x.
- Willicombe, M., Roufosse, C., Brookes, P., Galliford, J.W., Mclean, A.G., Dorling, A., Warrens, A.N., Cook, T.H., Cairns, T.D., and Taube, D. (2011). Antibody-mediated rejection after alemtuzumab induction: incidence, risk factors, and predictors of poor outcome. *Transplantation*. 92, 176-182.10.1097/TP.0b013e318222c9c6.
- Wolf, S.D., Dittel, B.N., Hardardottir, F., and Janeway, C.A., Jr. (1996). Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 184, 2271-2278
- Worthington, J.E., Martin, S., Al-Husseini, D.M., Dyer, P.A., and Johnson, R.W. (2003). Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation*. 75, 1034-1040.10.1097/01.TP.0000055833.65192.3B.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 28, 639-650.10.1016/j.immuni.2008.03.017.
- Youinou, P., Jamin, C., and Lydyard, P.M. (1999). CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol. Today*. 20, 312-316
- Yuan, X., Paez-Cortez, J., Schmitt-Knosalla, I., D'addio, F., Mfarrej, B., Donnarumma, M., Habicht, A., Clarkson, M.R., Iacomini, J., Glimcher, M.P., and Littman, D.R. (2008). CD5 is a marker for a subset of B cells that express high levels of Bcl-2 and are resistant to apoptosis. *J. Exp. Med.* 205, 1111-1121.10.1084/jem.20072082.

L.H., Sayegh, M.H., and Ansari, M.J. (2008). A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J. Exp. Med.* 205, 3133-314410.1084/jem.20081937.

Zarkhin, V., Kambham, N., Li, L., Kwok, S., Hsieh, S.C., Salvatierra, O., and Sarwal, M.M. (2008). Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int.* 74, 664-67310.1038/ki.2008.249.

**ARTICLE N°2: B-cells display an  
abnormal distribution and an  
impaired suppressive function in  
patients with chronic antibody  
mediated rejection.**

*In press à Kidney International, 2013*

# **B-CELLS DISPLAY AN ABNORMAL DISTRIBUTION AND AN IMPAIRED SUPPRESSIVE FUNCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC ANTIBODY MEDIATED REJECTION**

<sup>1</sup>Alexandre Nouël, BSc, <sup>1,2</sup>Isabelle Ségalen, MD,  
<sup>1,3</sup>Christophe Jamin, PhD, <sup>4</sup>Laurent Doucet, MD,  
<sup>5</sup>Sophie Caillard, MD, <sup>1,3</sup>Yves Renaudineau, Pharm D, PhD,  
<sup>1</sup>Jacques-Olivier Pers, DDS, PhD, <sup>1,2</sup>Yannick Le Meur, MD, PhD,  
<sup>1,3</sup>Sophie Hillion, PhD

<sup>1</sup>EA2216 "Immunology and Pathology" Université de Brest, SFR ScinBios, LabEx IGO "Immunotherapy Graft, Oncology", Brest, France

<sup>2</sup>Department of Nephrology, CHRU Cavale Blanche, Brest, France

<sup>3</sup>Laboratory of Immunology, CHRU Morvan, Brest, France

<sup>4</sup>Department of Anatomopathology, CHRU Morvan, Brest, France

<sup>5</sup>Department of Nephrology Transplantation, CHRU Strasbourg, Strasbourg, France

A.N. and I.S. contributed equally to this work

S.H. and Y.L.M. Seniors authors contributed equally to this work

Corresponding author: Jacques-Olivier Pers, Laboratory of Immunology, Brest University Medical School Hospital, BP824, F-29609, Brest, France. Phone: 33-298-22-33-84; Fax: 33-298-22-38-47; pers@univ-brest.fr

Source of support: AN was supported by a fellowship from the "Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie". This work has received support from the French government managed by the Agence Nationale de la Recherche under the " Investissements d'avenir " program with the reference ANR-11-LABX-0016-013 and a grant from Agence de la Biomédecine (AOR "Recherche et Greffe 2013").

**Running Title:** Regulatory B cells in renal transplantation

**Word Count:** 3992

## **Abstract**

In kidney transplantation, the composition of the B cell compartment is increasingly being identified as an important determinant for graft outcome. Whereas naïve and transitional B cells have been associated with long term allograft survival and operational tolerance, memory B cells have been linked to graft rejection and graft loss. Chronic antibody mediated rejection (cAbMR) now represents a major complication in transplantation and is a challenge in current therapeutics. In this study, we show that patients with cAbMR display a unique B cell phenotype with a reduction in the ratio of "activated B cells"/"memory B cells" associated with an impaired immunosuppressive activity. We further show that the regulatory functions of B cells depend on their maturation status. In conclusion, phenotypic and functional analyses of the B cell compartment could be indicated for appropriate follow-up after transplantation and drive therapy in the establishment of transplant tolerance processes.

**Keywords:** Chronic antibody mediated rejection, B-cell, regulatory B-cells, Kidney transplantation



## Introduction

Currently, immunotherapy in clinical transplantation is mainly directed at T cells to prevent acute T-cell mediated allograft rejection. However, long-term survival of organ allograft remains challenged by chronic rejection, a process in which B-cells have been found to play a significant role (Colvin et al. 2010). In renal allografts, chronic antibody (Ab) mediated rejection (cAbMR) is currently recognized as one of the most serious complications leading to numerous graft losses. cAbMR is primarily characterized by the development of donor specific Abs (DSA) and specific histological damages (Terasaki 2003; Colvin 2007). Recently, B lymphocyte functions have been revisited, and a novel category of B lymphocytes has been identified through studies on murine models of autoimmune diseases, cancer and transplantation. Called regulatory B cells (Bregs), these cells have the ability to dampen many immune processes (Lemoine et al. 2009). The secretion of IL-10 is one common feature of immunosuppressive mechanisms for Bregs in mice (Mizoguchi et al. 2002). Mauri et al. confirmed the existence of a homologous population in humans described as CD19<sup>+</sup> CD38<sup>high</sup> CD24<sup>high</sup> B cells that control Th1 differentiation (Blair et al. 2010). In addition to an IL-10 mediated suppressive effect, there is also strong evidence that a part of immunosuppressive function of B cells is mediated by interactions with other regulatory cell populations (Tretter et al. 2008; Lemoine et al. 2011). Several questions remain as to the exact nature of Bregs, especially in humans. For example, Bregs have been detected within the splenic marginal zone population (Lenert et al. 2005), whereas, other studies

suggested that Bregs may reside within the larger follicular B-cell subset (Gray et al. 2007). It is extremely difficult to find a definitive marker that can identify the majority of Bregs. Furthermore, much evidence suggests that Bregs appear after specific activation and thus questioning the significance of Breg exhibiting different phenotypes.

In this context, there is increasing evidence for a role of Bregs in the control of auto- and alloimmune responses. We therefore propose to study B cell regulatory function in a group of cAbMR patients. For this, we decided to explore the relationships between B cell distribution and suppressive activity in cAbMR patients compared to patients with a stable graft function without DSA. We found that patients with cAbMR display a unique phenotype with a reduction in the ratio of "activated B cells"/"memory B cells" associated with an impaired immunosuppressive activity.

## RESULTS

### *Clinical characteristics of the patients*

Twenty-seven stable (Table 1) and 17 cAbMR patients (Table 2) were included in our study. Due to our inclusion criteria, cAbMR transplant recipients were grafted for a longer time than stable patients (8.1 versus 3.3 years) (Table 3). They had a higher immunological risk since 6 patients had received a previous graft, two patients were highly sensitized prior transplantation with panel of reactive antibodies (PRA) > 85%, 4 patients had a pre-transplant PRA between 50 and 85%, and 4 patients had experienced acute cellular rejection (versus none in the stable group) (Table 3). Interestingly, none of these acute rejection episodes corresponded to acute AbMR. Consequently, the cAbMR group was more likely to receive anti-thymocyte globulins and to remain on triple therapy with steroids. However, for most of the patients, the immunosuppressive strategy was quite similar in both groups, including anti-calcineurin inhibitors and mycophenolic acid. All patients in the cAbMR group developed DSA (Table 2). One patient developed both anti-class I and II DSA, 3 only anti-class I DSA and the remaining patients had anti-class II Abs. One or two DSA were detectable per patient with a mean for the mean fluorescence intensity (MFI) of 8,867 for the immunodominant DSA. Among the anti-class II DSA, 78% were anti-DQ, 7% anti-DP and 14% anti-DR. Scores (from the Banff classification) for chronic glomerulopathy and capillaritis are presented in Table 2. As already described, transplant glomerulopathy which was present in all the biopsies was associated with capillaritis (here in 100% of the cases) and glomerulitis (94.1%). In

addition, as reported recently in the last Banff meeting in Paris (Mengel et al. 2012), 35.3% of the patients with cAbMR had a C4d negative biopsy (Table 2).

### ***Abnormal distribution of B cell subpopulations in cAbMR patients***

We first performed B-cell extensive immunophenotyping of the cAbMR and stable patients compared to 35 healthy volunteers. Consistent with previous studies, transplant recipients presented a profound B cell depletion affecting the absolute numbers of circulating B cells and resulted in a reduction in the percentages and absolute numbers of B cells in all transplant recipients compared to healthy volunteers (Figures 1A and 1B). To further analyze the B cell compartment, we used the Bm1-Bm5 classification to identify cells at different developmental stages (Pascual et al. 1994; Bohnhorst et al. 2001). We determined the  $(Bm2+Bm2')/(eBm5+Bm5)$  ratio that reflects the distribution of activated B cells on memory B cells amongst the B cell subsets (Binard et al. 2009) (Figure 1C). In patients with cAbMR, the mean ratio was reduced compared to stable patients ( $2.1 \pm 0.4$  vs  $5.2 \pm 0.7$ ,  $p=0.002$ ) and to healthy volunteers ( $3.4 \pm 0.3$ ,  $p=0.02$ ). This significant alteration of B cell distribution is detailed in Figure 1D. Patients with cAbMR displayed a predominance of  $IgD^- CD38^-$  late memory Bm5 cells ( $15.6 \pm 2.3\%$  vs  $8.6 \pm 1.6\%$  in HV,  $p=0.002$  and vs  $8.4 \pm 1.1\%$  in ST,  $p<10^{-3}$ ) and a lack of  $IgD^+ CD38^{+/-}$  (Bm2+Bm2') cells compared to stable patients and healthy volunteers. Furthermore, notwithstanding the presence of immunosuppressive drugs, the absolute numbers of late memory Bm5 cells in cAbMR patients were higher than in stable group ( $p<10^{-3}$ , Table S1). To further investigate the increase of late memory Bm5 cells in cAbMR

patients, we separated the memory B-cell population according to the expression of CD27 and IgD. Although the percentage of CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B cells was not significantly different (Figure 1E, upper left panel), the absolute number was higher in cAbMR compared to stable patients ( $37.2 \pm 4.9$  cells/ $\mu$ L vs  $24.4 \pm 4.4$  cells/ $\mu$ L,  $p=0.04$ ) (Figure 1E, upper right panel). Additionally, we demonstrated an increase in the percentage and absolute number of the post-switched IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> memory B cells in cAbMR patients compared to stable patients ( $16.9 \pm 2.3\%$  vs  $9.7 \pm 0.7\%$ ,  $p=0.006$  and  $25.0 \pm 4.1$  cells/ $\mu$ L vs  $11.9 \pm 2.2$  cells/ $\mu$ L,  $p=0.002$ ) but not compared to healthy volunteers (Figure 1E, lower panels). No difference in the percentages and absolute numbers of IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B cells were observed in all groups (data not shown). Furthermore, the MFI of HLADR expression was increased in IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> memory B cells from cAbMR patients compared to stable patients ( $p < 10^{-3}$ , Figure S1A). These observation suggest that cAbMR patients have an increased number of memory B cells with a potentially upregulated antigen presenting capacity.

To estimate the impact of long term immunosuppression on B cell phenotype, we compared the activated/memory B cell ratio in 9 stable patients (#19 to #27) with long time clinically stable renal function after transplantation ( $7.2 \pm 1.0$  years delay from transplantation) with cAbMR patients ( $8.1 \pm 1.5$  years, Table 3). We observed a ratio of  $3.8 \pm 0.4$  that remains statistically higher than the ratio found in the cAbMR group ( $2.1 \pm 0.4$ ,  $p < 0.004$ ). This suggests that B-cells display an unique phenotype during cAbMR not observed in patients with stable function at the same time after transplantation.

We further analyzed more deeply the naïve B-cell stage. We found that cAbMR patients were characterized by a striking decrease in the percentages and absolute numbers of CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> transitional B cells when compared to the stable group (2.5±0.4% vs 8.9±1.0% and 3.5±0.8 cells/μL vs 11.8±2.7 cells/μL, p<10<sup>-3</sup> and p=0.001, respectively) (Figures 1F and S1B). These transitional B cells can be resolved into two separate populations *i.e.* the CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup> T1-like subset and the CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD5<sup>-/low</sup> T2-like subset (Sims et al. 2005). We showed that the percentages of T1 but not T2 were reduced in cAbMR compared to stable patients, and both absolute numbers of T1 and T2 populations were significantly decreased in patients with cAbMR compared to stable patients and healthy volunteers (Figure S1C).

Taken together, these data indicate that cAbMR patients exhibited a wide B-cell dysregulation characterized by an abnormal distribution of the B-cell subpopulations.

### **Abnormal distribution of T cell subpopulation in cAbMR patients**

We also performed T-cell extensive immunophenotyping of 14 cAbMR and 15 stable patients compared to 17 healthy volunteers. The percentage of CD4<sup>+</sup> T cells was reduced in cAbMR patients while the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells was increased (Figure S2A). Consequently, in patients with cAbMR, the mean CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cell ratio was increased compared to stable patients (1.18±0.23 vs 0.57±0.08, p=0.03) and to healthy volunteers (0.60±0.04, p=0.04). Patients with cAbMR displayed a predominance of both CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>effector T cells

( $7.2 \pm 3.0\%$  vs  $0.9 \pm 0.3\%$  in stable patients,  $p=0.001$  and vs  $0.7 \pm 0.1\%$  in healthy volunteers,  $p=0.001$ ) and  $CD8^+CD45RA^+CD27^-$  effector T cells ( $44.2 \pm 4.4\%$  vs  $27.3 \pm 4.4\%$  in stable patients,  $p=0.007$  and vs  $19.6 \pm 3.0\%$  in healthy volunteers,  $p<10^{-3}$ ). A lack of naïve T cells was also observed in cAbMR compared to stable patients and healthy volunteers (Figure S2A). However, no difference was observed in the percentages of  $CD4^+$  or  $CD8^+CD45RA^-CD27^+$  central memory T cells and of  $CD4^+$  or  $CD8^+CD45RA^-CD27^-$  effector memory T cells. Altogether these data suggest that T cells in cAbMR are in a preactivated state.

### ***Defect in the suppressive activity of B cells from cAbMR patients***

As recently demonstrated, human B cells can exhibit regulatory capacity through inhibition of T-cell or dendritic cell functions (Blair et al. 2010; Morva et al. 2012). To evaluate the functional regulatory properties of peripheral B cells from patients, a co-culture assay was performed to assess the ability of CpG-activated B cells to inhibit polyclonal proliferation of autologous T cells (Lemoine et al. 2011). To minimize the risk of immunological conflict in the control group of stable patients, we selected a subgroup of 18 stable patients (ST patients #1 to #18) that fulfilled all the clinical and biological criteria of stability and that have had on top a protocol biopsy at one year post-graft transplantation free of histological disorders and particularly microcirculation inflammation (Table 1). As shown in Figure 2A (left panel), when purified B cells from cAbMR patients were added to the coculture assay, the proliferation of autologous T cells was barely inhibited. Thus, a significantly lower suppressive activity was observed at day 4 compared to healthy volunteers and to stable patients ( $3.7 \pm 8.1\%$  of

inhibition vs  $37.8 \pm 3.8\%$ ,  $p=0.006$  in healthy volunteers and vs  $39.5 \pm 2.5\%$ ,  $p=0.004$  in stable patients) (Figure 2A, right panel). This suppressive activity of B cells in healthy volunteers and stable patients was maintained for up to 5 days of co-culture and remained significantly higher compared with cAbMR patients, suggesting that cAbMR B cell regulation of T cell proliferation was defective over time in culture. In addition, we analyzed the suppressive capacity of B cells on Th1 cytokine production by autologous T cells at day 4 (Figure 2B). B cells isolated from cAbMR patients failed to efficiently regulate production of Th1 proinflammatory cytokines (such as  $\text{INF}\gamma$  and  $\text{TNF}\alpha$ ) in contrast to healthy volunteers and stable patients B cells ( $p=0.003$  and  $p=0.004$ , respectively for  $\text{INF}\gamma$  and  $p=0.002$  and  $p=0.0003$ , respectively for  $\text{TNF}\alpha$ ).

To ensure that the defect in inhibition of T cell proliferation by autologous B cells from cAbMR patients was not due to a resistance of T cells consequently to their preactivated state, purified B cells from healthy volunteers were added to the coculture assay in the presence of T cells from cAbMR patients (Figure S2B). The proliferation of cAbMR T cells at day 4 was significantly suppressed by heterologous B cells from healthy volunteers ( $24.7 \pm 5.5\%$  of inhibition with heterologous B cells vs  $3.7 \pm 8.1\%$  of inhibition with autologous B cells). Thus, the defect of regulation observed in cAbMR patients was not the consequence of a T cell insensitivity and can be clearly ascribed to a B cell regulatory deficiency.

For a better understanding of the regulatory deficiency of B cells in cAbMR patients, we analyzed the suppressive capacities of the two normal B cell subsets



whose distributions were altered in cAbMR. (Bm2+Bm2') activated and (eBm5+Bm5) memory cells from healthy volunteers were sorted (Figure 2C, upper panel) and their regulatory properties compared. After 4 days of co-culture, (Bm2+Bm2') cells have a higher inhibitory effect on T cells compared to (eBm5+Bm5) cells ( $56.3 \pm 4.3\%$  vs  $21.1 \pm 9.2\%$  of inhibition,  $p=0.005$ ) (Figure 2C, lower panel).

Taken together, these experiments support the notion that the regulatory function of B cells is altered in cAbMR and that disturbances in the distribution of circulating B cells might partly explain the overall capacity of B cells to become efficient regulatory B cells when activated.

### ***Characterization of B cell phenotype after coculture with T cells***

Recent data clearly suggested that human  $CD24^{\text{high}}CD38^{\text{high}}$  B cells display the most important regulatory capacity in *in vitro* assays (Blair et al. 2010). We wondered whether this population could be induced after activation in coculture with T cells in the several group of patients. We thus analyzed the phenotype of B cells at day 4 in co-culture. As shown in Figure 3A, a 2-fold induction of  $CD19^+CD24^{\text{high}}CD38^{\text{high}}$  B cells was observed in healthy volunteers ( $12.5 \pm 0.8\%$  at day 0 vs  $21.2 \pm 3.2\%$  at day 4,  $p=0.008$ ) and in stable patient cultures ( $9.4 \pm 1.4\%$  at day 0 vs  $21.4 \pm 2.4\%$  at day 4,  $p=0.003$ ). Although a similar increase of  $CD19^+CD24^{\text{high}}CD38^{\text{high}}$  B cells was observed in cAbMR patients after co-culture ( $p=0.001$ ), B cells remained predominantly  $CD24^{\text{low}}CD38^+$  compared to healthy volunteers ( $p=0.003$ ) and to stable patients ( $p=0.001$ ). Furthermore,

activated B cells from healthy volunteers and stable patients acquired or maintained a phenotype similar to  $\text{IgD}^+\text{CD38}^{+/high}$  Bm2/Bm2' cells that was lower in B cells from cAbMR patients (Figure 3B, upper right panel). The  $\text{IgD}^-\text{CD38}^{-/low}$  eBm5+Bm5 B cell population was concomitantly downregulated in healthy volunteers and stable patients ( $p < 10^{-3}$ ) but upregulated in the cAbMR group ( $p = 0.01$ ) (Figure 3B, lower right panel). These experiments confirmed that isolated B cells from cAbMR patients failed to develop into regulatory B cells leading to a defect in T-cell suppression.

## Discussion

Chronic humoral rejection emerged as one of the major causes of renal allograft failure. cAbMR can be considered as a continuing process starting with a dysregulation of the immune system mainly sustained by perturbation in B cell to T cell interactions, leading to DSA appearance followed by aggression of the endothelium of the microcirculation and after few months to cAbMR with specific histological features. One urgent need is the characterization of early biomarkers that can predict these phenomena.

In this study, we demonstrate for the first time, a defective function of regulatory B cells in the clinical situation of human graft rejection. This defect of regulation was not due to a resistance of T cells consequently to their preactivated state as already reported (Vallotton et al. 2011; Ortiz et al. 2013) because the proliferation of cAbMR T cells was suppressed by heterologous B cells from healthy volunteers. We also observed that patients with cAbMR displayed a unique B cell phenotype with a reduction of the ratio of "activated B cells"/"memory B cells". The cAbMR group exhibited clearly an increase of memory post-switched B cells with a strong antigen presenting capacity that are mainly involved in Ab production (Wu et al. 2013). One explanation might be the continuous stimulation of these memory B cells with allo- or auto-antigens. Another possibility is that the disturbance of B cell compartmentalisation in cAbMR patients could be due to impaired B-cell differentiation resulting in an exaggerated germinal center formation (Wasserstrom et al. 2008). One other

interesting observation in the cAbMR group is the striking reduction of the CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> transitional-like B cells previously described as being regulatory (Blair et al. 2010; Li et al. 2012). It has already been suggested in organ transplant recipients that deficiency of B cells with a transitional phenotype is associated with tolerance (Silva et al. 2001; Newell et al. 2010; Pallier et al. 2010). Although the existence of a unique "natural" Breg population is still controversial, it is accepted that some B cells could undertake regulatory functions when activated or in a particular microenvironment. Indeed, cells with the CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> phenotype do not constitute a homogeneous subpopulation and may include more than one type of B cells. For example, there is an overlap of these cells with CD5<sup>+</sup> B cells (Sims et al. 2005). Due to the difficulty in identifying specific surface markers for the Breg population, we decided to analyze the *in vitro* suppressive capacity of the B cells in a mixed population. We found that, in contrast to healthy volunteers and stable patients, B cells from cAbMR patients were unable to efficiently inhibit autologous T cell proliferation. Moreover, we demonstrated that B cells could have different regulatory abilities depending on their maturation status. Thus, peripheral blood (Bm2+Bm2') activated cells represent the most potent suppressive B-cell subpopulation compared to (eBm5+Bm5) memory subset which is associated with increasing T cell responses (Shlomchik and Weisel 2012) and allograft rejection (Burns et al. 2009). Furthermore, we observed that the phenotype of activated B cells in coculture vary according to the phenotype initially present at the onset of the experiment. In this regard, B cells from cAbMR patients, who

present a lack of transitional B cells and an important over-representation of memory B cells, are unable to induce the  $CD19^+IgD^+CD24^{high}CD38^{high}$  regulatory B-cell phenotype (Figure 3). It is therefore important to emphasize that B cells exhibit plasticity with their function being dependent on immune regulatory processes favoring either immunity or tolerance based on the micro-environmental stimuli they are exposed to. Altogether, abnormal B-cell distribution in cAbMR patients likely contributes to the altered regulatory capacities of the B cells.

It should be noted that there was one possible limitation to our study. Most of the patients from the stable group were recruited in the second year post-transplantation allowing us to use the one year protocol biopsy together with the negative DSA as a confirmation of the lack of ongoing immunological phenomena. Due to the recommendation of our local ethics committee, we did not performed biopsy for the subgroup of the 9 stable patients with longer follow up. Consequently, the stable control group was different with regard to time since transplantation, exposure to immunosuppression and transplant demographics. However, the activated/memory B cell ratio was statistically higher in the 9 stable patients presenting a similar delay after transplantation than in the cAbMR patients. Similarly, we observed that this ratio was also decreased in the 15 steroid-treated cAbMR subjects compared to the 15 steroid-treated stable patients ( $2.4 \pm 0.5$  vs  $4.8 \pm 0.7$ ,  $p=0.01$  respectively). Overall, the abnormal distribution of peripheral blood B cells observed in cAbMR patients was likely due to the ongoing immunological process and not to treatments. Therefore, despite the

differences in our groups (*i.e.* delay from transplantation or immunosuppression regimen), we strongly suggest that B cells display an unique phenotype during cAbMR, not observed in patients with stable function and with the same range of immunosuppression.

In conclusion, we propose that B cell profiling should include looking at all B cell sub-populations instead of focusing on a “typical” compartment. While our results can not be taken as evidence of pathogenesis, this profile combined with other immunological features, like suppressive activity analysis, should be tested for their prospective value with regard to progression through the chronic rejection process. Longitudinal studies that monitor both patient and disease progression in cAbMR patients are ongoing in our laboratory in order to determine a relationship between B cell phenotype and B cell function during the natural history of rejection if any. Nevertheless, analysis of the B-cell compartment could be potentially useful for defining cellular biomarkers that identify specific defects in patients and might guide future therapy in transplantation.

## MATERIALS AND METHODS

### *Patients*

We compared two groups of disease donor renal transplant recipients with healthy volunteers free of disease and drug treatment (healthy volunteers, n=35). All patients and volunteers gave informed consent and the ethics committee of the Brest University Medical School Hospital approved the study according to the declaration of Helsinki.

Identification of anti-class I and anti-class II HLA-DSA was made by Luminex<sup>®</sup> analysis (One Lambda Inc., Caroga Park, CA, USA) using sets of 96 beads (class I) and 76 beads (class II). All patients were DSA negative at the time of the transplant.

Twenty-seven patients with stable kidney transplant were included (Table 1). These patients were grafted for more than one year. They had a stable renal function, a proteinuria of less than 0.5g/24h and they never displayed a cellular or humoral rejection. The annual DSA screening was negative. Among them, the first 18 patients (#1 to #18, Table 1) had a one-year protocol biopsy which was free of histological evidence of rejection, microcirculation lesions or glomerulopathy. Furthermore, C4d staining was negative. This group of 18 stable patients with clinical and histological guaranties on the lack of immunological conflict was selected for the functional study. The remaining 9 stable patients were selected with regard to time since transplantation (they were grafted for more than 5 years) and exposure to immunosuppression to be comparable to

cAbMR patients. They did not have a recent biopsy because of stable function, negative DSA and no proteinuria. Finally, for all of them the annual DSA assay had to be negative (Table 1). None of the patients with normal renal function at inclusion developed chronic rejection during the next few months.

The cAbMR group (n=17) included patients with renal dysfunction measured as an increase of creatininemia and proteinuria. According to the Banff consensus, they all developed DSA. One patient developed both anti-class I and II DSA, 3 only anti-class I DSA and the remaining patients had anti-class II Abs. All graft biopsies presented typical transplant glomerulopathy with various degrees of glomerulitis and capillaritis (Table 2). Due to the limitation of the C4d staining and following the confirmation of the existence of authentic C4d-negative ABMR (Mengel et al. 2012) not all biopsies in this group were C4d positive.

None of the patients included in this study received treatments that modify B cell responses such as rituximab, bortezomib, intravenous immunoglobulin or eculizumab.

### ***Cell isolation***

Peripheral blood cells were purified from the blood of patients and controls donors by negative selection using RosetteSep procedure to isolate T-cells. B cells were further purified by negative selection with a B cell enrichment kit (Stem Cell Technologies). All preparations were >95% pure in B cells (CD19<sup>+</sup>) and >98% pure in CD19<sup>-</sup> CD5<sup>+</sup> T cells.



### ***Cell culture***

Cells were cultured in 96-well plates in complete medium. T cells were seeded at  $4 \times 10^4$  cells/ml on AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch). They were stimulated with anti-CD3 (OKT3; 0.2 µg/ml; BioLegend, CA) and anti-CD28 (CD28.2; 0.2 µg/ml; Beckman Coulter) mAbs. For the co-culture experiments, B cells were added at 1:1 ratio with CpG (human ODN 2006; 0.25 µM; Cayla-InvivoGen) for 5 days. For proliferation assays, isolated T cells were labeled with CFSE (5 µM; Invitrogen-Molecular Probes) before stimulation. T cell proliferation was evaluated by flow cytometry on a FC500 (Beckman Coulter) by measuring the decrease in the MFI of CFSE.

### ***ELISA assays***

Commercial ELISA kits with paired Abs were used to detect IFN $\gamma$  (Beckman Coulter) and TNF $\alpha$  (Beckman Coulter) in the culture supernatants at different dilutions.

### ***Flow cytometry and cell sorting***

Since storing cells in liquid nitrogen could affect the expression of some markers and may modify cell distribution, the cytometry assays were carried out using freshly blood samples obtained at routine patient visits. All mAbs are listed in supplemental Table S2. B cell populations were sorted using an Epics Elite flow cytometer (Beckman Coulter). The purity of the B-cell subsets was greater than 95%.

### ***Statistical analysis***

All data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using Prism5 GraphPad Software. Data were deemed significant when  $p < 0.05$ .

## **Disclosure statement**

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

## References

1. Colvin, R.B., et al., *Emerging role of B cells in chronic allograft dysfunction*. Kidney Int Suppl, 2010(119): p. S13-7.
2. Terasaki, P.I., *Humoral theory of transplantation*. Am J Transplant, 2003. **3**(6): p. 665-73.
3. Colvin, R.B., *Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1046-56.
4. Lemoine, S., et al., *Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work?* Ann N Y Acad Sci, 2009. **1173**: p. 260-7.
5. Mizoguchi, A., et al., *Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 219-30.
6. Blair, P.A., et al., *CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients*. Immunity, 2010. **32**(1): p. 129-40.
7. Tretter, T., et al., *Induction of CD4+ T-cell anergy and apoptosis by activated human B cells*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4555-64.
8. Lemoine, S., et al., *Human T cells induce their own regulation through activation of B cells*. J Autoimmun, 2011. **36**(3-4): p. 228-38.
9. Lenert, P., et al., *TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production*. J Clin Immunol, 2005. **25**(1): p. 29-40.
10. Gray, M., et al., *Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(35): p. 14080-5.
11. Mengel, M., et al., *Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection*. Am J Transplant, 2012. **12**(3): p. 563-70.
12. Pascual, V., et al., *Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 329-39.
13. Bohnhorst, J.O., et al., *Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3610-8.
14. Binard, A., et al., *Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjogren syndrome?* Ann Rheum Dis, 2009. **68**(9): p. 1447-52.
15. Sims, G.P., et al., *Identification and characterization of circulating human transitional B cells*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4390-8.
16. Morva, A., et al., *Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes*. Blood, 2012. **119**(1): p. 106-14.
17. Ortiz, Y.M., et al., *Memory phenotype and polyfunctional T cells in kidney transplant patients*. Transpl Immunol, 2013. **28**(2-3): p. 127-37.
18. Vallotton, L., et al., *Monitoring of CD4+CD25highIL-7Ralphahigh activated T cells in kidney transplant recipients*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(8): p. 2025-33.
19. Wu, G., et al., *The role of memory B cell in tonsil and peripheral blood in the clinical progression of IgA Nephropathy*. Hum Immunol, 2013.

20. Wasserstrom, H., et al., *Memory B cells and pneumococcal antibody after splenectomy*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3684-9.
21. Li, X., et al., *Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia*. Blood, 2012. **120**(16): p. 3318-25.
22. Newell, K.A., et al., *Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans*. J Clin Invest, 2010. **120**(6): p. 1836-47.
23. Silva, R.A., T.F. Pais, and R. Appelberg, *Blocking the receptor for IL-10 improves antimycobacterial chemotherapy and vaccination*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1535-41.
24. Pallier, A., et al., *Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype*. Kidney Int, 2010. **78**(5): p. 503-13.
25. Shlomchik, M.J. and F. Weisel, *Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells*. Immunol Rev, 2012. **247**(1): p. 52-63.
26. Burns, A.M., et al., *Memory alloreactive B cells and alloantibodies prevent anti-CD154-mediated allograft acceptance*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1314-24.

## **Acknowledgements**

The authors thank Professor Peter Lydyard for editorial help and for critically reading the manuscript. They also thank Simone Forest and Geneviève Michel for secretarial assistance. Alexandre Nouël was supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

**Table 1:** Immunological characteristics of stable (ST) patients

Patient	Initial nephropathy	Previous transplantation	Previous cellular rejection	Induction therapy	Time since transplantation (months)	Maintenance immunosuppression therapy	DSA	Biopsy
ST1	FSGS	0	No	IL2R	13	Cyclo/Cs/MPA	No	Yes
ST2	Reflux nephropathy	0	No	IL2R	17	Tacro/MPA	No	Yes
ST3	IgA	0	No	No	12	Tacro/Cs/MPA	No	Yes
ST4	Alport	0	No	No	15	Tacro/MPA	No	Yes
ST5	GPA	0	No	IL2R	12	Tacro/MPA	No	Yes
ST6	PKD	0	No	IL2R	20	Tacro/MPA	No	Yes
ST7	FSGS	0	No	IL2R	30	Tacro/Cs/MPA	No	Yes
ST8	PKD	0	No	IL2R	20	Tacro/MPA	No	Yes
ST9	Unknown	0	No	No	14	Tacro/Cs/MPA	No	Yes
ST10	Unknown	0	No	IL2R	36	Cyclo/Cs/MPA	No	Yes
ST11	Unknown	0	No	IL2R	12	Tacro/MPA	No	Yes
ST12	Unknown	0	No	IL2R	12	Cyclo/MPA	No	Yes
ST13	GPA	0	No	IL2R	12	Cyclo/MPA	No	Yes
ST14	IgA	0	No	IL2R	14	Cyclo/MPA	No	Yes
ST15	Unknown	0	No	IL2R	12	Cyclo/Cs/MPA	No	Yes
ST16	Hypertension	0	No	IL2R	14	mTORi/Cs	No	Yes
ST17	Unknown	0	No	IL2R	14	Tacro/Cs/MPA	No	Yes
ST18	Unknown	0	No	IL2R	15	mTORi/Cs/MPA	No	Yes
ST19	IgA	0	No	IL2R	126	Cyclo/Cs/MPA	No	No
ST20	Goodpasture	0	No	Thymo	124	Tacro	No	No
ST21	Alport	0	No	IL2R	60	Tacro/MPA	No	No
ST22	IgA	0	No	IL2R	145	Cyclo/MPA	No	No
ST23	IgA	0	No	IL2R	63	Cyclo/Cs/MPA	No	No
ST24	GPA	0	No	IL2R	61	Cyclo/Cs	No	No
ST25	PKD	0	No	IL2R	48	Belatacept/Cs/MPA	No	No
ST26	IgA	0	No	IL2R	92	Cyclo/Cs/MPA	No	No
ST27	Hypertension	0	No	IL2R	66	Cyclo/Cs/MPA	No	No

CNI: calcineurin inhibitor; Cs: corticosteroids; Cyclo: cyclosporine; DSA: Donor specific antibodies; FSGS: Focal Segmental Glomerulosclerosis; GPA: Granulomatosis with polyangiitis; Hypertension: nephrosclerosis; IgA: IgA nephropathy; IL2R: IL2-receptor antibodies; MPA: Mycophenolic acid; mTORi : mTor inhibitors; PKD: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease; Tacro: tacrolimus; Thymo: thymoglobulin.

**Table 2:** Immunological characteristics of patients with chronic antibody mediated rejection (cAbMR)

Patient	Initial nephropathy	Previous transplantation	Previous cellular rejection	Induction therapy	Time since transplantation (months)	Maintenance immunosuppression therapy	DSA class 1	DSA class 2	BANFF Classification	C4d
cAbMR 1	PKD	0	No	IL2R	36	mTORi/Cs/MPA	0	DR15 (9,000) DQ7 (19,932)	g1cg2cpt3	pos
cAbMR 2	Goodpasture	2	No	Thymo	30	Tacro/Cs/MPA	0	DP9 (4,000)	g0cg2cpt3	pos
cAbMR 3	Reflux nephropathy	0	No	No	171	Cyclo/Cs/MPA	B44 (7,649) B62 (4,027)	DQ5 (16,590) DQ3 (16,385)	g1cg2cpt2	pos
cAbMR 4	IgA	0	Yes	No	69	mTORi/Cs/MPA	A24 (7,476)	0	g3cg2cpt1	neg
cAbMR 5	PKD	0	Yes	Thymo	108	Tacro/Cs/MPA	0	DQ3 (12,178)	g2cg1cpt1	pos
cAbMR 6	IgA	0	No	Thymo	21	Tacro/Cs/MPA	0	DQ4 (14,348)	g2cg2pt2	pos
cAbMR 7	Reflux nephropathy	2	No	Thymo	20	Tacro/Cs/MPA	0	DP4 (4,000)	g2cg3cpt2	pos
cAbMR 8	IgA	0	Yes	IL2R	156	Tacro/Cs/MPA	A1 (3,275)	0	g1cg1cpt2	pos
cAbMR 9	IgA	0	No	IL2R	89	Tacro/Cs/MPA	0	DQ2 (11,500)	g2cg2cpt2	pos
cAbMR 10	Unknown	0	No	IL2R	144	Cyclo/MPA	A29 (2,425)	0	g2cg3cpt2	neg
cAbMR 11	Reflux nephropathy	2	No	Thymo	41	Tacro/Cs/MPA	0	DQ3 (7,307)	g2cg3cpt2	neg
cAbMR 12	Unknown	1	No	IL2R	57	Tacro/Cs/MPA	0	DQ6 (4,000)	g3cg2cpt3	neg
cAbMR 13	IgA	0	No	Thymo	156	Cyclo/MPA	0	DQ6 (9,773)	g3cg2cpt3	pos
cAbMR 14	Unknown	1	No	Thymo	44	Tacro/Cs/MPA	0	DP9 (19,414)	g1cg3cpt3	pos
cAbMR 15	Unknown	0	No	Thymo	60	Tacro/Cs/MPA	0	DR17 (2,115)	g3cg3cpt0	neg
cAbMR 16	Unknown	0	No	Thymo	216	Tacro/Cs/MPA	0	DQ5 (6,720)	g3cg3cpt3	pos
cAbMR 17	IgA	1	Yes	Thymo	234	Cyclo/Cs/MPA	0	DQ5 (5,699)	g3cg3cpt0	neg

cg: chronic glomerulitis; cpt: capillaritis; Cs: corticosteroids; Cyclo: cyclosporine; DSA: Donor specific antibodies; g: glomerulitis; IL2R: IL2 receptor antibody; MPA: Mycophenolic acid; mTORi : mTOR inhibitors; PKD: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease; pos: positive; neg: negative; Tacro: tacrolimus; Thymo: thymoglobulin.



**Table 3.** Characteristics of patients with stable graft function (ST) and with chronic antibody mediated rejection (cAbMR)

<b>Patients characteristics</b>	<b>ST</b>	<b>cAbMR</b>	<b>P</b>
total number (n)	27	17	
Median age (range)	53.44 (25-74)	54.65 (27-73)	ns
Female, n (%)	8 (29.6)	3 (17.6)	ns
Serum creatinine (μmol/L)	111.11 (77-180)	183.10 (101-271)	<10 <sup>-3</sup>
Proteinuria (g/24h)	0.19 (0.03-0.50)	1.35 (0.12-6.55)	<10 <sup>-3</sup>
<b>Autoimmune disease (n, %)</b>	4 (14.8)	1 (5.9)	ns
<b>Previous graft</b>			
>1, n (%)	0 (D)	6 (35.3)	0.002
Delay from transplantation (year)	3.3 (1-12)	8.1 (1.7-19.5)	0.001
<b>Pre-transplant immunization</b>			
PRA >10%, n (%)	0	8 (47.1)	<10 <sup>-3</sup>
50 <PRA> 85, n (%)	0	4 (23.5)	
PRA >85%, n (%)	0	2 (11.8)	
<b>Immunosuppressive regimen</b>			
Induction therapy, n (%)	24 (88.9)	15 (88.2)	ns
Antithymocyte globulin	1 (3.7)	10 (58.8)	<10 <sup>-3</sup>
Anti-IL-2R	23 (85.2)	5 (29.4)	<10 <sup>-3</sup>
Tacrolimus or Cyclosporine A	24 (88.8)	15 (88.2)	ns
Tacrolimus	12 (44.4)	11 (64.7)	ns
Cyclosporine	12 (44.4)	4 (23.5)	ns
MPA	24 (88.9)	17 (100)	ns
Steroids	15 (55.6)	15 (88.2)	0.04
Belatacept	1 (3.7)	0	ns
mTORinhib	2 (7.4)	2 (11.8)	ns

Anti-IL-2R: anti-IL-2 receptor; MPA: mycophenolic acid; mTORinhib: mamalian target of rapamycin inhibitor; PRA: panel of reactive antibodies; *P*: Fisher test or Chi2 test for qualitative values, Mann-Whitney test for quantitative values.

## Titles and legends

### Figure 1: Abnormal distribution of B cells in chronic antibody mediated rejection

(cAbMR) subjects. Freshly isolated PBMC from 35 healthy volunteers (HV, ■), 27 patients with a stable graft function (ST, ●) and 17 cAbMR (▲) patients were analyzed by flow cytometry. (A) Frequency of CD19<sup>+</sup> B cells in circulating lymphocytes depicted as individual values. (B) Absolute numbers of peripheral blood B cells/μL in the different groups. (C) Individual values of Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5 ratio. (D) Representative histograms of IgD and CD38 expression on CD19<sup>+</sup> gated B cells in each group. B cell distribution (mean of percentage) of the five mature subpopulations (Bm1 to Bm5) and frequency of Bm2+Bm2' and late memory Bm5 in each group are shown (mean±SEM). (E) Frequency and absolute numbers/μL of CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B cells and CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> B cells represented as individual values in each group. (F) Frequency and absolute numbers of CD24<sup>++</sup>CD38<sup>++</sup> transitional cells gated on CD19<sup>+</sup> B cells. Differences were evaluated with Mann and Whitney t tests. \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

### Figure 2: B cells from cAbMR patients are defective in regulatory functions.

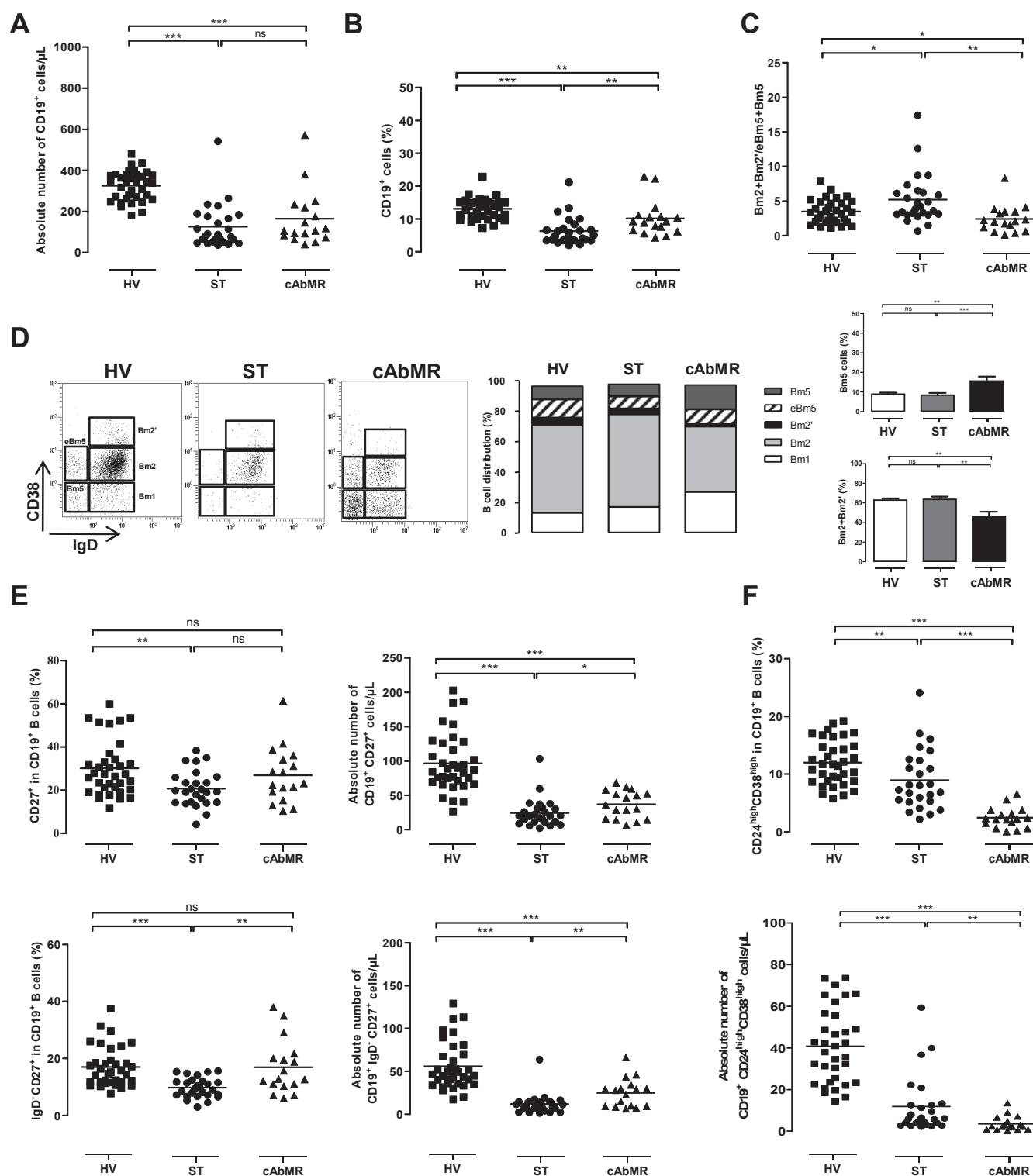
Peripheral blood B cells and T cells were isolated from 18 healthy volunteers (HV, ■), 12 patients with a stable graft function (ST, ●) and 16 cAbMR patients (▲). CFSE-labeled T cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 Abs for 5 days with or without B cells added at day 0 and stimulated with 0.25μM CpG ODN. (A) Representative flow cytometric

analysis of diluted CFSE at day 4 in the presence or absence of B cells to evaluate the T cell proliferation in the three groups (left panel). B cell suppression of T cell proliferation is expressed as the percentage inhibition of proliferation relative to T cells cultured alone (right panel). **(B)** Secretion of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  was determined by ELISA at day 4 in supernatants of T cells cultured alone or in the presence of B cells. **(C)** (Bm2+Bm2') and (eBm5+Bm5) B cells from the peripheral blood of HV were sorted by flow cytometry according to the expression of IgD and CD38 gated on CD19<sup>+</sup> cells. Sorted B cells were added to autologous purified T cells and co-cultured for 4 days. Significant differences were estimated by Mann and Whitney and paired t tests. \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 3: B cells from chronic antibody mediated rejection (cAbMR) patients showed an altered phenotype after 4 days of co-culture with autologous T cells, and cAbMR sera display autoreactivity.** B cells from healthy volunteers (HV), stable graft function (ST) and cAbMR patients were stained with **(A)** anti-CD19/anti-CD24/anti-CD38, **(B)** anti-CD19/anti-CD38/anti-IgD Ab combinations on freshly isolated cells (d0) or after a 4-day period of co-culture (d4) with autologous T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 Abs. Representative flow cytometry histograms were depicted on CD19<sup>+</sup> cells in the different groups (left panels). Frequencies (mean $\pm$ SEM) of **(A)** CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>, **(B)** IgD<sup>+</sup>CD38<sup>+/high</sup> and IgD<sup>-</sup>CD38<sup>-/low</sup> B cells were determined in the three

groups (right panels). Significant differences were estimated by Mann-Whitney and paired  $t$  test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Figure 1



214

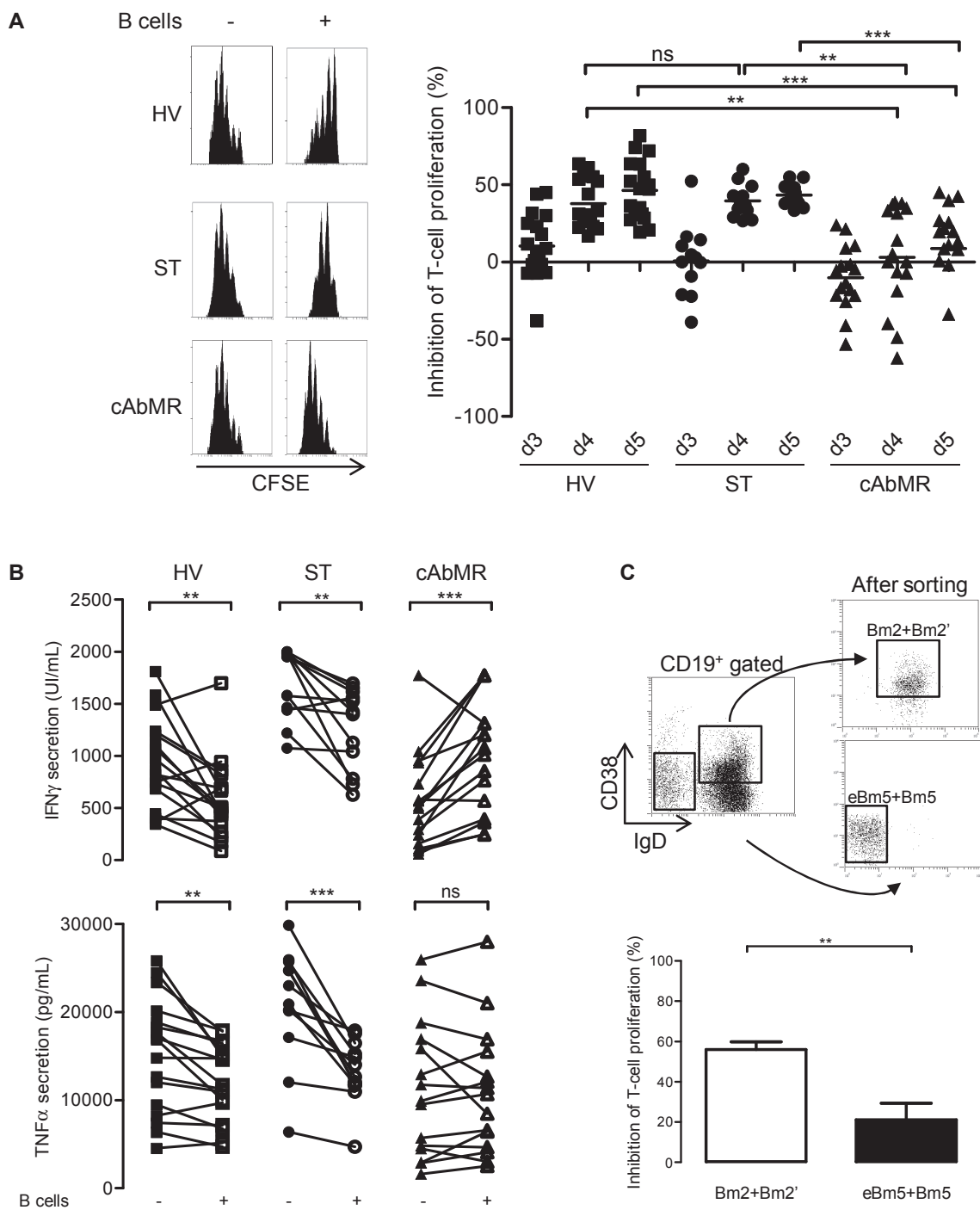
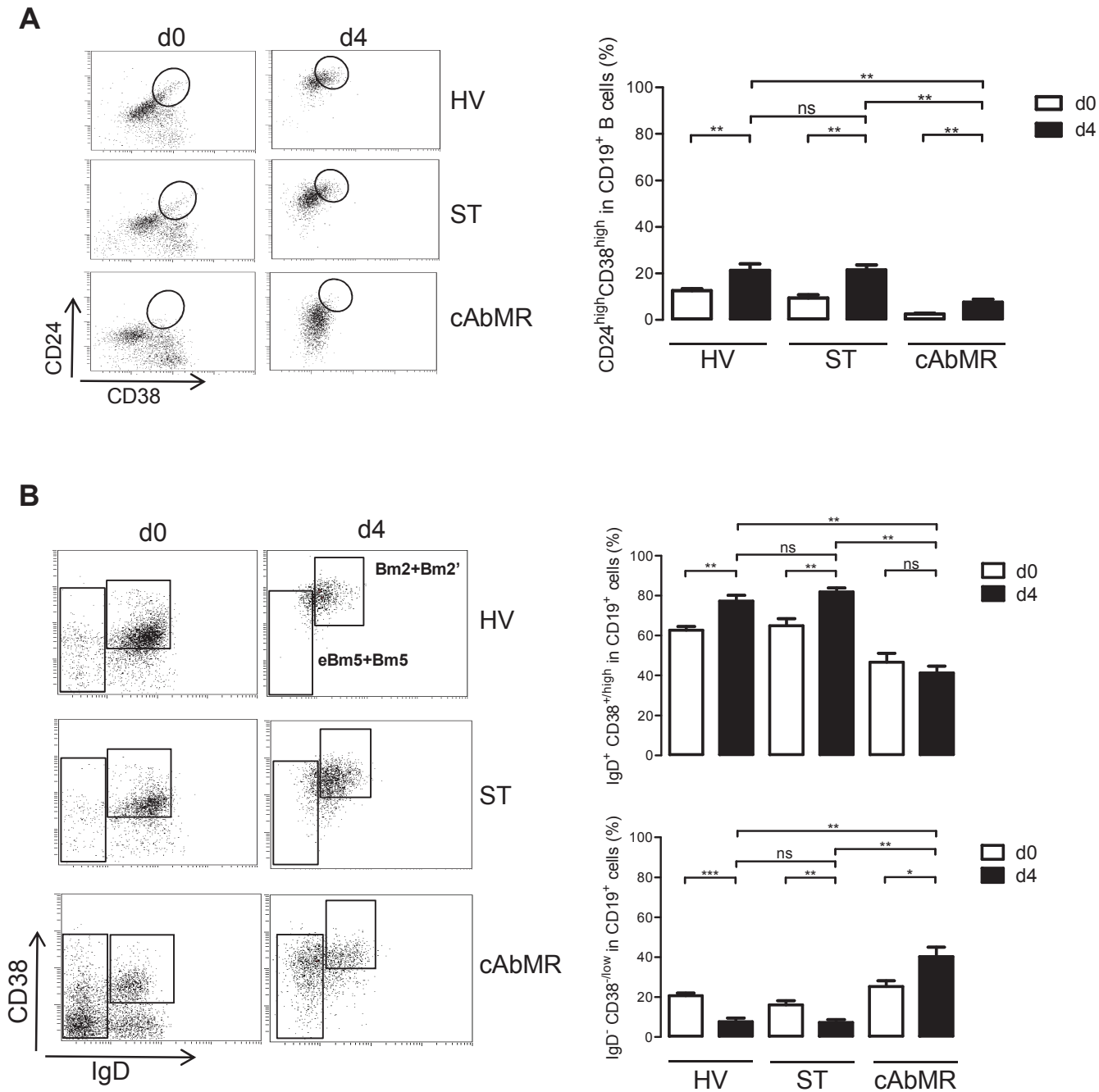


Figure 3



## Supplemental tables and Figures:

**Table S1: Absolute numbers/ $\mu$ l of blood B-cell subsets or subset combinations**

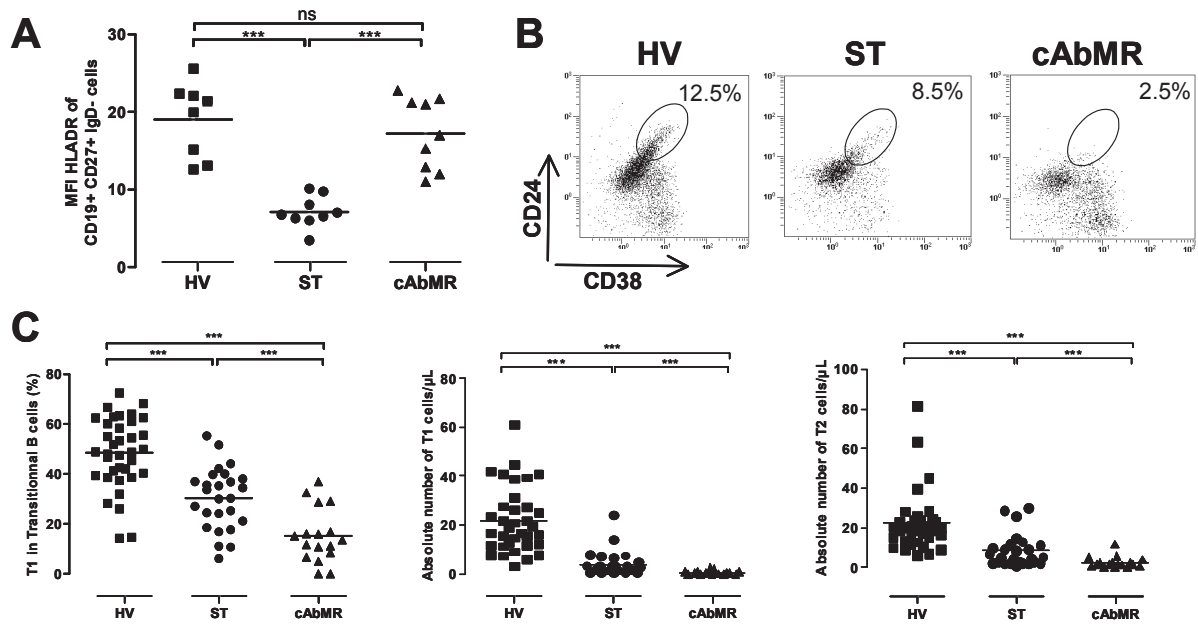
<b>B cell subsets or combination of subsets</b>	<b>cAbMR (n=17)</b>	<b>ST (n=27)</b>	<b>HV (n=34)</b>
Bm1	41.4 (9.6)	17.2 (3.6) $P<10^{-3}$	50.2 (8.9) NS
Bm2	81.1 (26.0)	76.9 (13.6) NS	193.6 (9.3) $P<10^{-3}$
Bm2'	1.8 (0.4)	4.0 (0.7) $P=0.007$	25.1 (9.4) $P<10^{-3}$
Bm2+Bm2'	82.9 (26.0)	80.9 (13.9) NS	208.8 (8.9) $P<10^{-3}$
eBm5	14 (2.1)	10.4 (2.1) NS	38.5 (3.1) $P<10^{-3}$
Bm5	25.3 (5.3)	10.0 (2.2) $P<10^{-3}$	27.9 (2.4) NS
eBm5+Bm5	38.7 (6.5)	19.7 (4.3) $P=0.002$	61.4 (5.2) $P=0.002$
Bm2+Bm2'/eBm5+Bm5	2.1 (0.4)	5.2 (0.7) $P=0.002$	3.4 (0.3) $P=0.02$

Mean (SEM) absolute numbers were measured in patients with chronic antibody mediated rejection (cAbMR), compared with patients with a stable graft function (ST) and with healthy volunteers (HV). All  $P$  values were determined in comparison to patients with cAbMR (Mann-Whitney  $t$  test).



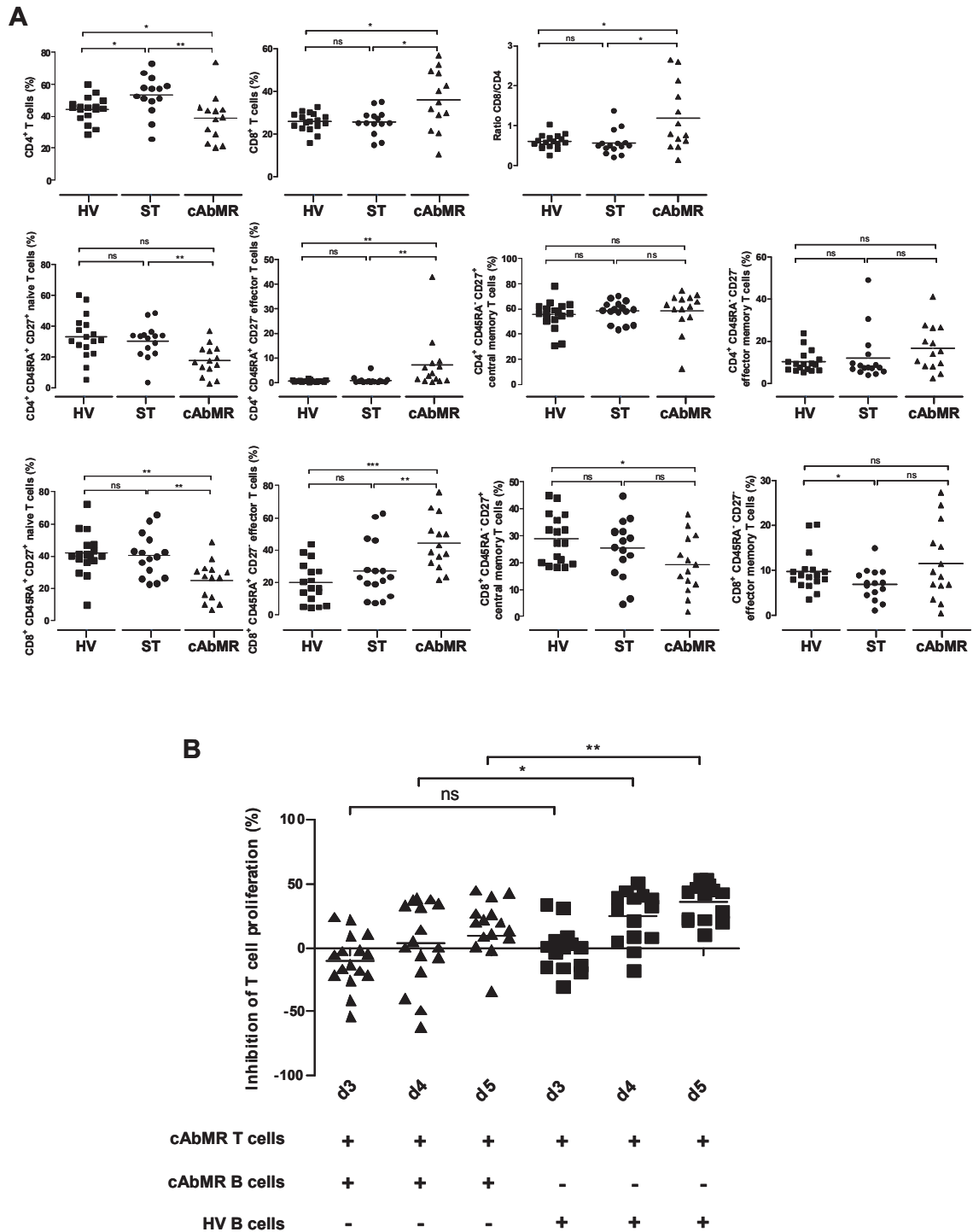
**Table S2 : Antibody characteristics**

<b>Antibody</b>	<b>Conjugate</b>	<b>Clone</b>	<b>Company</b>
Anti-CD27	Phycoerythrin (PE)	1A4-CD27	Beckman Coulter
Anti-IgD	PE	IA6-2	BD Biosciences
Anti-IgD	Fluorescein Isothiocyanate (FITC)	IA6-2	BD Biosciences
Anti-CD24	PE	ALB9	Beckman Coulter
Anti-CD5	FITC	BL1a	Beckman Coulter
Anti-CD38	PE-Cyanine 5 (PC5)	L5198-4-3	Beckman Coulter
Anti-CD19	PC5	J3-119	Beckman Coulter
Anti-CD19	PE-Cyanine 7 (PC7)	J3-119	Beckman Coulter
Anti-HLADR	PC7	Immu-357	Beckman Coulter
Anti-CD8	PC5	B9,11	Beckman Coulter
Anti-CD4	PC7	SFC112T4D11	Beckman Coulter
Anti-CD45RA	FITC	ALB11	Beckman Coulter



**Supplemental Figure S1**

**Figure S1 : Abnormal distribution of B cells in chronic antibody mediated rejection (cABMR) patients.** (A) Mean intensity (MFI) of HLADR expression was determined on gated CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B cells by flow cytometry and shown as individual values in each group.  $P < 0.0001$ . (B) Representative dot plot showing the CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> population gated on CD19<sup>+</sup> B cells as previously described in healthy volunteers (HV), patients with stable graft function (ST) and cABMR patients. (C) Frequencies and absolute number/ $\mu$ L of CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup> (T1) and CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD5<sup>low/-</sup> (T2) gated on CD19<sup>+</sup> B cells shown as individuals values in each group. Significant differences estimated by Mann-Whitney t tests ( $***P < 0.001$ ).



**Figure S2 : T cells in chronic antibody mediated rejection (cAbMR) patients present an abnormal distribution but can be regulated by heterologous B cells from healthy volunteers (HV).** (A) Freshly isolated PBMC from 17 HV (■), 15 patients with a stable graft function (ST, ●) and 14 cAbMR (▲) patients were analyzed by flow cytometry. Frequency of CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> (or CD8<sup>+</sup>) CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> naïve T cells, CD4<sup>+</sup> (or CD8<sup>+</sup>) CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> effector T cells, CD4<sup>+</sup> (or CD8<sup>+</sup>) CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> central memory T cells and CD4<sup>+</sup> (or CD8<sup>+</sup>) CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> effector memory T cells are shown as individual values in each group. (B) Peripheral blood B cells were isolated from healthy volunteers (HV, ■) and cAbMR patients (▲), stimulated with 0.25μM CpG ODN and incubated with anti-CD3 and anti-CD28 Abs stimulated CFSE-labeled T cells from cAbMR patients for 5 days. B cell suppression of T cell proliferation is expressed as the percentage inhibition of proliferation relative to T cells cultured alone. Differences were evaluated with Mann and Whitney t tests. \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

## ETUDE DU LYMPHOCYTE B AU COURS DU REJET D'ALLOGREFFE RENALE

Le rejet d'allogreffe représente un obstacle majeur en transplantation rénale humaine. Le lymphocyte B (LB) joue un rôle lors de cette réaction contre le greffon, mal défini à ce jour. Notre objectif a été de caractériser et identifier son implication dans le rejet humoral chronique (cABMR) et le rejet cellulaire aigu (ACR).

Dans une première partie, le phénotypage des LB a été effectué chez les patients cABMR et ACR en utilisant la cytométrie en flux. Il a également été réalisé sur des cellules issues de volontaires sains ou de patients greffés avec une fonction rénale stable, ce qui a permis de constituer deux groupes contrôles. Cette étude a mis en évidence d'importantes différences dans la distribution des sous-populations de LB uniquement chez les patients cABMR. Ce déséquilibre est caractérisé par une augmentation des LB mémoires au détriment des LB préalablement décrits avec un potentiel régulateur.

Etant donné qu'aucune anomalie phénotypique des LB n'a été observée chez les patients ACR, l'hypothèse d'une réaction localisée au sein du greffon a été retenue. Des coupes de biopsies rénales ont été analysées par microscopie confocale. Un infiltrat, constitué de lymphocytes B et T, a été observé uniquement chez les patients ACR. Il semblerait que les LB soient CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>.

Dans une seconde partie, l'activité fonctionnelle et régulatrice des LB issus de patients cABMR et ACR a été évaluée. Pour cela, un modèle *in vitro* de coculture entre des LB et des LT en présence de CpG a été mis en place. Cette étude a révélé que les LB, issus des patients cABMR uniquement, sont dépourvus de fonctions régulatrices sur l'activité des LT. De manière intéressante, cette observation est corrélée avec notre étude phénotypique où justement les populations B avec le plus grand potentiel régulateur faisaient défaut. Le rejet cABMR pourrait donc être partiellement expliqué par une anomalie de distribution des sous-populations de LB.

Cette étude a aussi mis en exergue que les LB des patients cABMR présentaient une déficience dans la sécrétion de molécules immunosuppressives telles que le TGFβ, l'IL-10 et IDO. Ce défaut conduit à une incapacité à générer des lymphocytes T régulateurs. Cette observation semble propre aux LB issus des patients cABMR. En effet, les LB provenant des groupes contrôles, ainsi que ceux du groupe ACR, régulent l'activité des LT. Il est donc évident que les deux types de rejet font appels à des mécanismes immunologiques distincts.

Le rejet ACR est entre autre orchestré par des lymphocytes T sécréteurs d'IL-17 (appelés Th17). Un modèle *in vitro* de différenciation de lymphocytes Th17 a été mis en place afin d'évaluer la capacité régulatrice des LB sur ces cellules. Chez le sujet sain, les LB inhibent la différenciation en Th17. Ce genre d'approche est envisageable avec des cellules issues de patients ACR afin d'évaluer si les LB présenteraient une incapacité à restreindre la génération de Th17.

Finalement, notre étude a clairement démontré le rôle du LB dans les mécanismes physiopathologiques conduisant au rejet. Lors du rejet humoral chronique, il existe une profonde anomalie dans la distribution des sous-populations de LB associée à un défaut fonctionnelle de ces cellules. Au niveau du rejet cellulaire aigu, les LB présents au sein du greffon suggèrent une réponse immunitaire localisée qui reste à définir.

Ces travaux ont donc permis d'affiner la compréhension de ces deux types de rejet et génèrent d'éventuelles perspectives pour définir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la lutte contre le rejet d'allogreffe.